Einführung in die mikroskopische Technik



von

Becher & Demoll

EINFÜHRUNG IN DIE MIKROSKOPISCHE TECHNIK

FÜR NATURWISSENSCHAFTLER UND MEDIZINER

VON

DR. S. BECHER UND DR. R. DEMOLL
PRIVATDOZENTEN A. D. UNIVERSITÄT GIESSEN

1913
VERLAG VON QUELLE & MEYER IN LEIPZIG.

Vorwort.

Das vorliegende Büchlein soll eine leicht verständliche Anleitung zur Herstellung mikroskopischer Präparate darstellen. Es schildert und erklärt für den Anfänger den Gang und den Sinn der oft verwickelten mikrotechnischen Maßnahmen und bietet doch auch dem Fortgeschrittenen alle diejenigen Spezialvorschriften, die sich bei mikroskopischen Arbeiten der Zoologen, Anatomen usw. als vorteilhaft erwiesen haben. Die speziellen Methoden zur Untersuchung der Bakterien und parasitischen Protozoen mußten unberücksichtigt bleiben; diese Seite der Mikrotechnik hat sich zu einem besonderen Gebiet ausgewachsen, für das zahlreiche und auch kurz gefaßte Leitfäden vorliegen. Dem Studenten und dem Lehrer, die für sich oder für den Unterricht eine Demonstrationssammlung von Präparaten anlegen, dürfte das Buch ein bequemer Führer sein. Besonders ist auch Rücksicht genommen auf die Bedürfnisse der Doktoranden und aller derjenigen Forscher, die nicht selbst durch fortwährendes Probieren ein sicheres Urteil bei der Auswahl unter der Unzahl veröffentlichter Anweisungen besitzen. Daher sind in den meisten Abschnitten die bewährten und unbedingt zuverlässigen Methoden stark in den Vordergrund geschoben, so daß der Suchende immer einen bestimmten gut gebahnten Weg vorgezeichnet findet. Nur in den Abschnitten über Fixieren und Färben mußte die Aufzählung verschiedener Rezepte naturgemäß einen breiteren Raum einnehmen.

Die allgemeinen mikrotechnischen Methoden sind in der Form geschildert, in der sie im hiesigen zoologischen Institut seit Jahren erprobt und angewendet werden. Der Kenner

der Literatur wird nicht wenige neue Verfahren finden, die wir auf Grund hinreichender Erfahrung empfehlen können. Unsere Namen sind dabei nicht genannt, wie denn überhaupt meist von einer Anführung von Autoren und Literatur zu gunsten der erstrebten Kürze und Billigkeit des Werkchens abgesehen werden mußte. Es versteht sich von selbst, daß trotzdem neben eigenen Erfahrungen die Angaben anderer Autoren reichlich berücksichtigt sind. Besonders mußten natürlich nicht wenige Rezepte nach den Originalarbeiten oder nach schon vorhandenen Zusammenstellungen gegeben werden. Für die Niederschrift haben wir den Stoff des Büchleins in der Weise verteilt, daß der eine (Becher) die Einleitung, das Einbetten und Schneiden, die Einschlußmittel, die Imprägnationen und das Schleifen behandelte, während der andere (Demoll) die übrigen Kapitel übernahm. Die Abschnitte über Einbetten und Schneiden stellen eine leichte Umarbeitung der von E. Leitz herausgegebenen „Anleitung zum Gebrauch des Mikrotoms" (von S. Becher) dar. Die Einheitlichkeit der Darstellung dürfte durch diese Arbeitsteilung nicht gelitten haben, da jeder von uns im allgemeinen nur Interpret des vorher besprochenen Gegenstandes oder gemeinsam gemachter Erfahrungen war. Auch wurde die erste Niederschrift natürlich gemeinsam überarbeitet.

Hinweise auf Mängel unserer Darstellung und auf neue technische Fortschritte werden wir dankbar begrüßen.

Gießen, Zoologisches Institut
der Universität.

Dr. Becher. Dr. Demoll.

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung.

Es ist ein dringendes Erfordernis und eine Pflicht des Forschers, in seinen Darlegungen die wirklich beobachteten Tatsachen von den darauf gegründeten Hypothesen nach Möglichkeit zu trennen. Andererseits aber darf man nicht vergessen, daß sich die wissenschaftliche Arbeit selbst nicht in bloß passive Beobachtung und in deren nachträgliche theoretische Verwertung zerlegen läßt. Die gedankliche Verknüpfung älterer Beobachtungen drängt uns zu neuen Untersuchungen und leitet zu neuen Beobachtungen, und die Beobachtung ist oft schon im Moment, wo sie gemacht wird, für den Forscher Zeuge für oder gegen irgend eine Hypothese oder Meinung. Beobachtung und gedankliche Verwertung treten bei wissenschaftlicher Arbeit in engster Verflechtung auf, das eine zieht das andere nach sich und nur, wo beides zusammengegeben ist, kann es zu wirklich förderlichem Flusse der wissenschaftlichen Forschung kommen. So wird verständlich, daß im allgemeinen der klarere Denker auch der bessere Beobachter sein wird.

Es ist schwer und liegt jedenfalls nicht im Ziel der folgenden Darstellung, die Fähigkeit, Tatsachen gedanklich zu verknüpfen, erheblich zu steigern. Dagegen besteht für jeden angehenden Forscher in ausgedehntem Maße die Möglichkeit, andere Voraussetzungen guter wissenschaftlicher Beobachtung erheblich günstiger zu gestalten. Diese Möglichkeit liegt in der schnellen und gründlichen Aneignung der Technik einer Wissenschaft, die sich selbst durch mühsame Arbeit einzelner Forscher im Laufe von Jahrzehnten entwickelt hat. Allerdings liegen auch in der technischen Seite wissenschaftlicher Arbeit Momente, die nicht durch

das Studium eines Buches vermittelt werden können, nämlich angeborenes technisches Geschick und die hier wie überall äußerst förderliche lange Übung.

Auch für die Aneignung eines großen Teils der technischen Methoden selbst ist das Studium eines Buches nicht der beste Weg. Die direkte Anleitung eines erfahreneren Lehrers an Objekt und Instrumenten selbst wird in den meisten Fällen besser zum Ziele führen. Aber auch für denjenigen, für den günstige technische Unterrichtsgelegenheit besteht, ist ein technischer Leitfaden nicht überflüssig. Er bietet Gelegenheit zu Repetition und zur Aneignung von Methoden, die man selbst nicht Gelegenheit hatte, direkt gezeigt zu bekommen. Die mikroskopische Technik ist zurzeit schon ein sehr ausgedehntes Gebiet, ein Gebiet, in dem es zudem sehr vieles gibt, das sich nicht als Gedächtnismaterial eignet und trotzdem unentbehrlich ist, man denke zum Beispiel an die zahlreichen Rezepte für Fixierungs- und Färbungsmittel. Neben der allgemeinen Erklärung der einzelnen technischen Maßnahmen ist daher ein großer Teil der folgenden Abschnitte der kurzen Mitteilung über Zusammensetzung, Herstellung und Gebrauch einzelner Hilfsmittel gewidmet.

Dieser erste Abschnitt soll einigen Beobachtungsregeln allgemeinerer Natur gewidmet sein.

Zunächst kann als ganz allgemeiner Grundsatz nicht genügend betont werden, *daß man immer versuchen soll, mit seinem Untersuchungsgegenstand nach jeder Richtung hin möglichst vertraut zu werden.* An einem neuen Untersuchungsobjekt sieht man zu Anfang gewöhnlich sehr wenig. Dabei kann es gar nichts nutzen — in den meisten Fällen sogar nur schaden — wenn wir durch stärkere und stärkste Vergrößerung oder durch Anwendung komplizierter vorbereitender Beobachtungsmethoden mehr zu sehen versuchen. Wir sind noch nicht mit dem Gegenstand vertraut, wir beobachten allerhand, ohne es näher zu beachten

und ohne seine Bedeutung zu erfassen. Es geht, wie wenn wir einen uns bisher fremden Menschen allmählich näher kennen lernen. Erst ganz allmählich lernen wir allerhand Kleinigkeiten beachten und kommen endlich dahin, seine Meinung oder Stimmung aus den geringfügigsten Ausdrucksbewegungen richtig erkennen zu können. Auch die erste Betrachtung des zoologischen Objektes hat oft etwas außerordentlich Entmutigendes. Man fragt sich oft, wie war es früheren Beobachtern möglich, an einem solchen Gegenstand soviel zu erkennen. Hier hilft es nur, sich immer wieder mit dem Gegenstand zu beschäftigen. Man lernt bald in einen Wust von inneren Organen, der vielleicht schwach durch die Körperwand durchschimmert, Ordnung zu bekommen, zunächst vielleicht nur an einem Punkte und allmählich immer weiter fortschreitend. Wir lernen an kleinen geringfügigen Merkmalen wichtige Teile auseinanderhalten, deren Verschiedenheit uns zunächst ausgeschlossen schien usw. Auch wenn der Eindruck entsteht, auf diese Weise ist an einem Objekt nichts Neues mehr zu sehen, sollte man sich wenigstens zu Anfang immer wieder zu der scheinbar aussichtslosen Beobachtungsarbeit zwingen. Ein günstiger Zufall, ein kleiner Fortschritt ebnet uns dann plötzlich den Weg. Man bemerkt nicht selten schon zu Anfang Kleinigkeiten, die nebensächlich erscheinen und in denen man nicht wagt, etwas Wichtiges zu erblicken. Erst allmählich bemerken wir, wie konstant jene Kleinigkeit ist, wie sie vielleicht mit diesem oder jenem anderen Umstande gesetzmäßig zusammenhängt. Viele bahnbrechende Beobachtungen sind dadurch gemacht worden, daß der Entdecker unermüdlich seine Aufmerksamkeit gerade auf diejenigen Punkte richtete, die frühere Erforscher vielleicht gesehen, aber als nebensächliche Kleinigkeiten nicht näher verfolgt hatten.

Das völlige Vertrautwerden mit einem Gegenstand der Beobachtung setzt auch die genaue Kenntnis dessen voraus, was von früheren Beobachtern über das Objekt mitgeteilt

worden ist. Es genügt weder erst seine eigenen Beobachtungen anzustellen und dann die Literatur über den Gegenstand später nachzulesen, noch auch reicht es hin, erst die Literatur zu studieren und dann später lediglich der Beobachtung obzuliegen. Beides muß Hand in Hand gehen. Die Lektüre beeinflußt unsere Beobachtung, zuweilen in ungünstiger, meist aber in sehr förderlicher Weise. Das von anderen Gesehene, Beschriebene und Gezeichnete wiederzufinden, ist nicht annähernd so schwer, wie es selbst von neuem zu entdecken. Diesen Vorteil müssen wir uns zunutze machen. Und umgekehrt lesen wir später mit dem durch die eigene Anschauung geschärften Blick aus der Darstellung früherer Beobachter weit mehr heraus als zu Anfang. Daraus ergibt sich, daß wir unsere Beobachtung durch fortwährende neue Lektüre und unsere Lektüre durch fortgesetzte Beobachtung fruchtbarer zu machen versuchen müssen.

Gelegentlich kann es allerdings vorteilhaft sein, an ein Objekt in unbeeinflußter Weise heranzutreten. Aber man sollte diese Objektivität nicht durch Unkenntnis erkaufen. Fürchtet man eine zu starke Wirkung einer suggestiven Theorie oder Hypothese auf die eigenen Beobachtungen, so empfiehlt es sich in manchen Fällen, die Arbeit an geeignetem Punkte für einige Zeit zu unterbrechen und dann später womöglich von anderer Seite aus oder mit Hilfe einer neuen Methode an die Sache heranzutreten. Während solcher Pausen mag man irgend etwas allgemein Zoologisches lesen, das für den speziellen Gegenstand in Frage kommen könnte oder sich einem sorgfältigen Studium gerade der entgegengesetzten Anschauungen anderer Autoren widmen.

So sehr es zum Erfolg vonnöten sein kann, nicht allzuweit abzuschweifen und bei dem eigenen Problem zu bleiben, so unmöglich ist es doch, andererseits seine Beobachtungen in unnatürlicher Weise abzugrenzen und einzuschränken. Die Aussicht, eine wesentliche Entdeckung zu machen, vermindert sich wesentlich, wenn man sich etwa

bei anatomischen Studien lediglich auf die Kenntnis eines einzelnen Objektes beschränken wollte. Zum mindesten muß die Literatur der größeren oder kleineren Gruppe genau studiert werden. Sobald sich Beobachtungen ergeben, die Berührungspunkte mit allgemeineren Fragen darbieten, so muß die jene Probleme behandelnde Literatur herangezogen werden, auch dann, wenn in derselben das eigene Objekt niemals erwähnt worden ist.

Auch bei dem Objekt selbst sollte man seine Studien nicht unnatürlich begrenzen. Man kann nicht Untersuchungen über den Prothorax eines Insektes machen, ohne Kopf und die ganze Brust und die Organisation überhaupt zu berücksichtigen. Wer Ei- oder Samenbildung untersucht, muß mit der Lebensweise, speziell mit Eiablage und Befruchtung, mit der Zeit der Geschlechtsreife und mit Entwicklung usw. vertraut sein. Gerade die hochausgebildete Fixierungs- und Färbungstechnik hat manchen dazu verleitet die biologische und physiologische Orientierung zu vernachlässigen. Dem Anfänger mag man es noch allenfalls verzeihen, wenn er in der Freude über die Beherrschung einer neuen Technik eine Zeitlang Präparat auf Präparat herstellt, ohne der eigentlichen Beobachtung die gebührende Zeit zu widmen und wenn für ihn eine Zeitlang das Tier sozusagen erst nach dem Fixieren (also im abgetöteten Zustande) anfängt interessant zu werden.

Für die wissenschaftliche Arbeit selbst ist derartige Einseitigkeit äußerst gefährlich. Es kommt nicht selten vor, daß sich innerhalb der Wissenschaft derartige Tendenzen zu einer Art Mode ausbilden. Gerade das Aufkommen hervorragender technischer Fortschritte kann solche Richtungen begünstigen. So hat ohne Zweifel die fortgeschrittene Schneide- und Färbungstechnik das Einseitigwerden der morphologischen Richtung und ihre Trennung von physiologischer und biologischer Betrachtungsweise gefördert. Noch jetzt ist die mikroskopische Technik im wesentlichen morpho-

logische Technik, obwohl der Physiologe und Biologe das Mikroskop ebensogut brauchen und auch ihre eigenen technischen Methoden für ihre besonderen Zwecke ausgebildet haben.

Jedenfalls sollte auch der Morphologe nicht unterlassen, physiologische und biologische Gesichtspunkte immer mit im Auge zu behalten, auch wenn sich das für das spezielle Ziel als nicht unbedingt erforderlich erweist. Ebenso sollte der Physiologe oder der Experimentator und der biologische Beobachter nie den Bau des Tieres außer Acht lassen, denn wir wissen, daß Form und Funktion in einer engen Beziehung stehen.

Dem angehenden Morphologen kann vor allen Dingen nicht genug geraten werden, die Beobachtung des lebenden Tieres nicht zu vernachlässigen. Die hohe Ausbildung der Untersuchungsmethoden „fixierter" Objekte, die vielfach Resultate geben, wo die direkte Beobachtung versagt, verleitet gar zu leicht dazu, mit der Beobachtung des Tieres im Leben gar nicht ernstlich anzufangen. Und doch hat auch diese Methode — auch für den Morphologen — ihre ganz besonderen Vorteile. An dem oft etwas durchsichtigen lebenden Objekt läßt sich auch abgesehen von den Bewegungen des Tieres und seiner Organe manches sehen und besonders im Zusammenhang überblicken, was durch keine andere Methode in der Schönheit dargestellt werden kann. Die mikroskopischen Arbeiten eines K. E. v. Baer, eines Joh. Müller und vieler anderer, die im wesentlichen noch auf die Beobachtung des lebendigen Objektes angewiesen waren, sind denkwürdige Zeugnisse dafür, was sich alles mit dieser einfachsten Methode sehen und finden läßt.

Überhaupt ist es im allgemeinen von größtem Nutzen, jede Methode in ihrer Eigenart für die Untersuchung völlig auszunutzen. Eine wirklich gründliche Untersuchung des lebenden Objektes gibt die wichtigsten Anhaltspunkte für die spätere Untersuchung des konservierten Materiales.

Auch das getötete Objekt sollte nicht sogleich eingebettet und in Schnitte zerlegt, sondern vorher in toto genau untersucht werden. Über einem bestimmten inneren Organ ist in der Haut vielleicht eine Ausbuchtung, eine besondere Art von Kalkkörpern oder dergleichen anzutreffen. Die vorherige Untersuchung in toto gibt uns dann bei der Schnittuntersuchung sofort einen Zusammenhang, der uns sonst wahrscheinlich entgangen wäre. Die Untersuchung des ganzen Objektes bietet uns ferner bei der gedanklichen Rekonstruktion, die sich jeder nach den Schnitten macht, die besten topographischen Anhaltspunkte. Obwohl man, wie wir sehen werden, auch Methoden ersonnen hat, die es gestatten, aus Schnittserien ein Objekt exakt zu rekonstruieren, so wird gleichwohl wegen der Umständlichkeit dieser Methoden die gedankliche Rekonstruktion mit Unterstützung durch die Beobachtungen des ganzen Objektes stets seinen Wert behalten.

Auch nachdem einmal ein Objekt fixiert und zerlegt ist, sollte bei der weiteren Untersuchung nicht in einseitiger Weise verfahren werden. Für den Anatomen sind die Leistungen einer Injektion, für den Histologen diejenigen der Zellisolierung (Maceration) oft von unersetzlichem Nutzen, obwohl sie vielfach zugunsten des beliebteren Schneidens vernachlässigt werden. Doch läßt auch die Schnittmethode selbst wieder verschiedene Möglichkeiten offen, aus denen man Nutzen ziehen kann. Die Einbettung in Paraffin bietet die besseren Aussichten in bezug auf spätere Färbung, die etwas umständlichere Celloidinmethode gibt uns dagegen unbedingte Gewähr für die Erhaltung der richtigen Lagerungsverhältnisse der Teile eines Schnittes. Das Celloidin braucht nämlich ungleich dem Paraffin nicht aus den Geweben entfernt zu werden, so daß jeder an sich vielleicht im Schnitt freischwebende Teil in richtiger Lagerung gehalten wird.

Beim Schneiden selbst hat man nicht selten genug zu variieren, um eine tadellose Folge von Schnitten zu erhalten.

Für die Untersuchung selbst kommt die Wahl verschiedener Schnittdicken und der Schnittrichtung am meisten in Frage. Im allgemeinen kann man raten, nicht dünner zu schneiden als irgendwie nötig, denn mit der Verringerung der Schnittdicke steigt die Schwierigkeit der Rekonstruktion erheblich. Auch vergrößert sich mit der Schnittzahl natürlich die Mühe des Durchsehens in entsprechendem Maße. Ganz dünne Schnitte braucht man im allgemeinen nur zu histologischen Untersuchungen, es empfiehlt sich, neben der Anfertigung lückenloser Serien in der dem betreffenden Ziele am meisten angepaßten Schnittdicke noch einige Serien in geringerer Schnittdicke anzufertigen. Oft ergibt sich die Notwendigkeit, einige Partien des Objektes dünner zu schneiden. Gelegentlich — bei Mangel an Material — muß man sich damit helfen, nach einer Anzahl normaler Schnitte in derselben Serie einen dünneren Schnitt einzuschalten. Diese Methode empfiehlt sich aber durchaus nur in Ausnahmefällen; denn die verschiedene Schnittdicke bietet später gewöhnlich Schwierigkeiten für das Erhalten einer gleichmäßigen Färbung.

Die Variation der Schnittrichtung ist in den meisten Fällen zu empfehlen, in vielen unumgänglich. Aus drei Serien, deren Schnittrichtung etwa drei aufeinander senkrechten Ebenen entsprechen (Quer-, Frontal- und Sagittalschnitte) wird man sich ein besseres Bild des Ganzen machen können, als aus einer einzigen Folge von Schnitten. Oft handelt es sich darum, gerade eine bestimmte Schnittrichtung zu treffen, weil nur diese ein vollständiges Übersichtsbild von dem Zusammenhang verschiedener Teile darbietet. Dies läßt sich oft nur durch immer erneutes Probieren erreichen. Im allgemeinen richtet man sich in der Wahl der Schnittebene nach Symmetrieebenen oder besondern Organisationsverhältnissen des betreffenden Objektes; denn ein wahllos schräg verlaufender Schnitt durch ein vielleicht noch kontrahiertes oder gekrümmtes Tier bietet nicht selten ein sehr schwer verständliches Durcheinander dar.

Auch in bezug auf Färbung ist, wie bei den übrigen Etappen der Behandlung, ein Variieren sehr am Platze. Oft wird dies schon durch die verschiedenen Fixierungsmethoden erfordert, die man angewendet hat; denn manche Fixierungsmittel gestatten nur ganz bestimmte Färbungsmethoden. Wie beim Fixieren, so läßt sich auch beim Färben oft nicht von vornherein sagen, welche Methode die besten Resultate liefert. Ein gewisses Probieren ist also in beiden Fällen zu empfehlen. Indessen soll durchaus nicht dem unvernünftigen Durchprobieren aller möglichen Rezepte das Wort geredet werden. Es gibt eine Reihe von Methoden, die meist von vornherein die besten Resultate erwarten lassen. Eine ganze Anzahl anderer Methoden bieten demgegenüber nichts Neues. So hat es keinen Zweck, sie alle in jedem Falle zu versuchen. Besser ist es, neben einer allgemeinen Färbungsmethode solche mit speziellen Leistungen anzuwenden oder neben der Färbung ein Imprägnierungsverfahren in Anwendung zu bringen.

Die Variierung der Untersuchungsmethoden macht es unbedingt notwendig, sich genaue Notizen über die verschiedene Vorbehandlung der einzelnen Präparate zu machen. So sollte ein Objektträger selbst schon auf Etiketten Angaben über Namen der Tiere usw., über Fixierung, Färbung und Schnittdicke enthalten. Daneben ist es ganz allgemein empfehlenswert, bei jeder Untersuchung ein Buch zu führen, in dem alle Schritte der technischen Vorbereitung wie auch alle Beobachtungen kurz aber präzis eingetragen werden. Die Notizen, die wir während der Beobachtung eines lebenden Objektes z. B. am Meere niederschreiben, sind uns später, wenn wir vielleicht nur noch konserviertes Material zur Verfügung haben, von größtem Nutzen und durch das Gedächtnis nicht zu ersetzen. Es schadet gar nichts, wenn wir in dieses Buch auch Beobachtungen eintragen, von denen wir gar nicht wissen, ob wir sie später gebrauchen können. Gerade solche zufälligen gelegentlichen Beobachtungen können

im Lichte der fortgeschrittenen Untersuchung plötzlich von großer Bedeutung werden. In den meisten Fällen werden wir auch zum Schluß der Untersuchung finden, daß manches, was wir zunächst niedergeschrieben haben, nicht frei von Irrtum war oder unter dem Einfluß einer falschen Ansicht stand. Auch dies schadet durchaus nicht; denn das Beobachtungsjournal ist eben nicht die definitive Veröffentlichung.

Fast noch wichtiger als die fortlaufende genaue Notierung aller Beobachtungen und technischen Maßnahmen ist das Zeichnen des Beobachteten. Zunächst ist das Zeichnen von größtem didaktischen Wert. Wer zeichnet, zwingt sich zu genauerer Beobachtung. Für den Anfänger ist daher das Zeichnen ohne Hilfe eines Zeichenapparates zu empfehlen. Die genauere Beobachtung und die mit dem Zeichnen verbundene intensivere Beschäftigung bedingt auch ein weit besseres Haften des Gesehenen im Gedächtnis. Es ist ein großer Unterschied, ob man etwas aus einem Lehrbuche sich für kurze Zeit angeeignet hat, oder etwas demonstriert bekommen hat, oder ob man es selbst gefunden und Einzelheit nach Einzelheit zeichnerisch wiedergegeben hat. Das Vertrautwerden mit dem Objekt, von dem wir oben sprachen, erreicht man auf keinem anderen Wege besser, als durch die von fortwährendem Zeichnen unterstützte Beobachtung.

Aber auch für den Forscher ist möglichst eifriges Zeichnen von größter Bedeutung. Wenn es sich um Dinge handelt, die später in der Veröffentlichung wiedergegeben werden sollen, so ist die Anwendung eines Zeichenapparates (etwa eines Abbe'schen, eines Zeichenokulars oder des Projektionszeichenapparates) der Exaktheit wegen anzuraten. Besonders ist es empfehlenswert, die Umrisse der in einer Figur dargestellten Gegenstände mit dem Zeichenapparat festzulegen. Diese Umrißskizzen können dann später — natürlich unter fortwährender Beobachtung — mit freier Hand weiter schattiert und sonstwie weiter ausgeführt werden. Die Übung im

Freihandzeichnen ist also auch durch den Gebrauch eines Zeichenapparates durchaus nicht überflüssig geworden. Viele zeichnerisch wenig Begabte verlieren zu Anfang oft gegenüber der Aufgabe, ein kompliziertes mikroskopisches Bild darzustellen, den Mut. Demgegenüber muß gesagt werden, daß nach tausendfältig bestätigter Erfahrung fast jeder durch Übung sich so viel vom Zeichnen aneignen kann, daß es für die allermeisten Zwecke des Mikroskopikers genügt. Denn obwohl unter sonst gleichen Umständen eine zeichnerisch und künstlerisch bessere Figur natürlich vorzuziehen ist, muß man bedenken, daß peinliche Genauigkeit in dem, was man darstellen will, das Haupterfordernis der biologischen Zeichnung ist. Diese Genauigkeit darf weder unter mangelhafter Zeichnung leiden, noch auch einer künstlerischen Darstellung zu Liebe geopfert werden. Genauigkeit in der Wiedergabe ist auch noch höher zu schätzen als die Klarheit der Zeichnung, wir dürfen der Klarheit zu Liebe nicht auf die höchste Genauigkeit verzichten. In den meisten Fällen ist das allerdings sehr wohl zu vereinigen. In Fällen aber, wo größere suggestive Kraft von einer Zeichnung gewünscht wird, als die direkte genaue Wiedergabe leisten kann, ist es besser, mit einer neuen schematischen (und als schematisch charakterisierten) Figur nachzuhelfen. Es ist jedoch sehr wohl gestattet, Figuren, die in bestimmter Hinsicht eine Wiedergabe des Objektes darstellen, in anderer Hinsicht unausgeführt zu lassen und durch Anwendung verschiedener Farben zu verdeutlichen. In einer Abbildung, in der es uns nur auf das gegenseitige Lagerungsverhältnis von Organen ankommt, brauchen vielleicht nur deren Umrisse genau wiedergegeben zu sein, die histologische Struktur, die sich im mikroskopischen Bild darbietet, kann unter solchen Verhältnissen weggelassen werden. Auch kann man die verschiedenen Teile einer solchen Figur noch durch Anlegen mit verschiedenen Farben deutlicher gegeneinander abgrenzen. In derartigen Fällen, die sehr häufig vorkommen, ergibt sich gewöhnlich schon von

selbst, inwieweit eine Figur genau sein will, und inwieweit sie der Übersichtlichkeit halber verdeutlicht ist. Nur muß man peinlich vermeiden dort zu vereinfachen und zu schematisieren, wo die Verhältnisse eine genaue Wiedergabe erwarten lassen. Wenn die Möglichkeit vorliegt, daß ein Schema für eine direkte Zeichnung gehalten wird, sollte man nie versäumen, den schematischen Charakter hervorzuheben.

In neuerer Zeit hat die Mikrophotographie häufige Anwendung zur Wiedergabe des Gesehenen gefunden. Aus dem eben Gesagten geht aber schon hervor, daß die Photographie trotz ihrer Genauigkeit nicht das Ideal einer mikroskopischen Abbildung darzustellen braucht. Bei der Zeichnung kann man Einzelheiten, die sich bei verschiedener Einstellung des Mikroskopes zeigen, nebeneinander zur Darstellung bringen, während die Photographie immer nur eine dünne Ebene des Präparates scharf wiedergibt. In der Zeichnung können wir schon immer eine beschränkte Rekonstruktion vollziehen. Dies ist oft ein Vorteil, zuweilen allerdings auch ein Nachteil gegenüber der Photographie. Im allgemeinen garantiert auch die Anwendung eines Zeichenapparates die erforderliche Exaktheit in dem, was gezeigt werden soll; doch ist in manchen strittigen Fällen, in denen sich das subjektive Moment des Beobachters leicht in der Darstellung und vielleicht ohne Absicht bemerkbar macht, das Zeugnis der Photographie von großem Nutzen. Wo es sich um Darstellung flächenhafter Gebilde handelt und wo es auf die Wiedergabe des Ganzen mit allen seinen Einzelheiten ankommt, ist die Photographie von unschätzbarem Wert, während sie meist dort nicht anzuwenden ist, wo es angebracht erscheint, vieles als nicht in Betracht kommend wegzulassen. Völlig ersetzen kann die Mikrophotographie das Zeichnen dem Mikroskopiker unter keinen Umständen.

Die allgemeinen technischen Hilfsmittel des Mikroskopikers sind natürlich zu einem großen Teile dieselben, die er als präparierender Zootom oder als Biologe auf der

Exkursion braucht. Solche Instrumente, wie Netze zum Fangen kleiner Wassertiere, Aquarien zur Zucht von Beobachtungsmaterial usw. sollen an dieser Stelle keine besondere Besprechung erfahren. Der Arbeitsplatz für mikroskopische Untersuchungen soll ein Fenstertisch sein. Gutes Licht ist eins der ersten Erfordernisse. Deshalb braucht das Fenster aber durchaus nicht Sonne zu haben und nach Süden gerichtet zu sein. Das gleichmäßige Licht eines nördlichen Fensters ist sogar vorzuziehen. Bei direktem Sonnenlicht pflegt man sich durch Vorstellen eines mit Leinen bespannten Rahmens eine gleichmäßiger beleuchtete Fläche herzustellen, von der man das Licht nehmen kann.

Der Tisch zu mikroskopischem Arbeiten kann etwas niedriger sein als ein gewöhnlicher Tisch. Auf den Tisch sollten Flaschen mit destilliertem Wasser, mit 50 %, 70 %, 96 % und absolutem Alkohol immer zur Hand sein. Ferner je eine Flasche mit Xylol, mit Chloroform und ein Fläschchen mit Kanadabalsam. Die immer gebrauchten kleinen Hilfsmittel, die man zweckmäßig in einem gemeinsamen Kasten aufbewahrt, sind Skalpells verschiedener Größe, Rasiermesser, Spatel aus Metall und Horn zum Übertragen der Objekte aus den verschiedenen Medien, ferner eine große und eine ganz feine Schere, weiter Nadeln und Präpariernadeln mit Handgriff usw. Dann sollten größere und feinere Pipetten mit Gummikappe, weitere und engere Glasröhren und Glasstäbe stets zur Hand sein. Außerdem ist es zweckmäßig, in dem Instrumentenkasten Urschälchen oder andere kleine Schalen, Pinsel von verschiedener Größe und dergleichen immer bereit zu halten.

Über Objektträger und Deckgläschen und über die besonderen Instrumente für die einzelnen technischen Maßnahmen wird in späteren Abschnitten berichtet werden. Über unser wichtigstes Hilfsmittel, das Mikroskop selbst und die übrigen in Betracht kommenden optischen Instrumente muß auf Spezialdarstellungen verwiesen werden.

Untersuchung lebender Tiere unter dem Mikroskop.

Nur kleine Tiere können für eine mikroskopische Untersuchung in toto und ohne voraufgegangene Abtötung in Betracht kommen, und unter diesen eignen sich auch wieder nur die, die mehr oder weniger durchsichtig sind, Bedingungen, die wir am häufigsten bei den im Wasser lebenden Tieren erfüllt finden. (Protozoen, Larvenformen der verschiedensten Tiergruppen, kleinere Formen der Würmer, der Krebse etc.) Es wird sich also meist darum handeln, das Objekt in Wasser zu untersuchen. Besondere Maßnahmen sind erforderlich, um die Tiere in der gewünschten Lage festzuhalten, ohne ihnen Schaden zuzufügen. In vielen Fällen wird dies dadurch erreicht, daß man das Tier in einem Wassertropfen auf den Objektträger bringt, und nun vorsichtig ein Deckglas auflegt. Der Deckglasdruck genügt häufig, um kleineren Krebsen, Insektenlarven u. a. ihre Bewegungsfreiheit zu nehmen.

Sind die Tiere aber zu zart, um diesen Druck auszuhalten, so müssen die Deckgläschen mit Füßchen versehen werden. Hierzu wählt man Wachs oder Plastilina und verfährt so, daß man mit den Ecken des Deckgläschens leicht über die betr. Masse hinritzt. Die abgeschabte Masse bildet an den Ecken kleine „Füßchen", die durch zarten Druck beim Aufsetzen beliebig erniedrigt werden können. Sowohl in diesem Falle, als auch bei den kleinsten Formen, bei denen der Deckglasdruck überhaupt nicht in Betracht kommen kann, muß das Ruhigstellen des Tieres auf andere Weise erstrebt werden. Man kann eine leichte Betäubung (s. später) anwenden, oder man bringt die Tiere in ein indifferentes, zähflüssiges, aber klares Medium wie Gummilösung (Kirschgummi). Dies empfiehlt sich besonders für einige Protozoengruppen. Es bietet diese Methode gegenüber dem Betäuben noch den Vorteil, daß die Bewegungen der einzelnen Körperteile erhalten bleiben und so infolge ihres verlangsamten Tempos leicht eingehender untersucht werden können.

Wenn es sich darum handelt, dieselben Objekte längere Zeit ohne Schädigung zu beobachten, wenn z. B. die Entwicklung einer Larvenform untersucht werden soll, so sind besondere Maßnahmen erforderlich, einmal um ein Verdunsten des Wassers zu verhindern und dann, um dem Tier immer frisches Wasser zu bieten.

Verläuft die Entwicklung sehr langsam, und sind die Larven widerstandsfähig, so lassen sich alle Schwierigkeiten dadurch umgehen, daß man das Objekt von Zeit zu Zeit betäubt und zur Untersuchung auf den Objektträger bringt. Insektenlarven erholen sich jeweils wieder sehr schnell und entwickeln sich ungestört weiter.

Doch gestatten nicht alle Tiere eine derartige Behandlung. Je nach der Größe der Objekte genügt es dann schon, einen hohlgeschliffenen Objektträger zu verwenden; wird hier das Deckglas flach aufgelegt, so tritt im Verhältnis zu der größeren Flüssigkeitsmenge die Verdunstung schon wesentlich zurück. Und da der Brechungsexponent von Wasser und Glas nicht allzu verschieden ist, so wird durch die Konkavität des Objektträgers die Helligkeit nicht nennenswert herabgesetzt. Die Wasserzirkulation wird in einfachster Weise dadurch hergestellt, daß man etwas erhöht ein kleines Gefäß mit Wasser aufstellt, aus dem eine fein ausgezogene Röhre auf den Objektträger führt. In die freie Öffnung derselben wird das eine Ende eines Streifens Fließpapier oder eines Wollfadens eingepaßt, dessen anderes Ende sich direkt an dem Rand des Deckglases dem Objektträger auflegt. Auf der entgegengesetzten Seite des Deckgläschens wird in gleicher Weise mit Hilfe eines Fließpapierstreifens oder eines Wollfadens das Wasser wieder abgesaugt.

Besonders intensiv wird die Verdunstung bei der Untersuchung im hängenden Tropfen. Hierbei wird das Deckglas, auf das ein Flüssigkeitstropfen samt dem zu untersuchenden Objekt gebracht worden ist, umgedreht und in der Weise hohl aufgelegt, daß sich nun das Tier

in einem hängenden Tropfen befindet. Ist eine derartige Untersuchung von längerer Dauer, so erfordert sie unbedingt irgendwelche Vorrichtungen, die das Verdunsten des Wassers verhindern. Man hat hierfür zahlreiche, verschiedene feuchte Kammern konstruiert, von denen wir nur eine, die sich durch ihre Einfachheit auszeichnet, kennen lernen wollen. Man schneidet sich aus Pappe ein Plättchen von der Breite des Objektträgers, aber nicht so lang. Dann bringt man in der Mitte einen Ausschnitt an, der kleiner ist als das Deckglas. Nachdem man jetzt die Pappe mit Wasser vollständig durchtränkt, und dann dem Objektträger angepaßt hat, wird das Deckglas mit dem Tropfen nach unten dem Ausschnitt aufgelegt. Der Tropfen hängt jetzt in einer Kammer, die

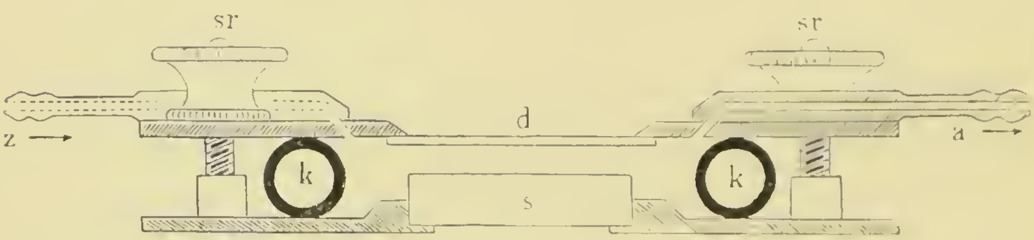


Fig. 1.

durch die in der Pappe enthaltene Feuchtigkeit stets mit Wasserdampf gesättigt ist.

Wenn es sich darum handelt, längere Zeit ein Objekt in bestimmter Lage fixiert zu beobachten, so wird man am zweckmäßigsten zu dem Ziegler'schen Durchströmungs-Kompressorium greifen (zu haben bei Firma Elbs, Freiburg i. Br. oder E. Leitz, Wetzlar). Es besteht aus (Fig. 1) zwei Metallplatten, die durch einen Ring aus festem Gummi (k) voneinander getrennt sind. Durch Schrauben (sr) kann jedoch der Abstand beliebig verringert werden. In der Mitte sind beide Platten durchbrochen. Hier ist eine stärkere (s) und eine dünnere (d) Glasplatte eingelegt, zwischen die das Objekt gebracht wird. Durch zwei Ansatzrohre, ein zuführendes (z) und ein abführendes (a) wird das Wasser ständig erneuert.

Dieselbe Vorrichtung kann auch als Gaskammer Verwendung finden, wenn das Objekt dem Einfluß bestimmter Gase ausgesetzt werden soll.

Bei manchen Untersuchungen ist es wünschenswert, die Objekte in völlig normaler Lage zu beobachten; und dann wird man bisweilen gezwungen sein, das Mikroskop nicht senkrecht, sondern wagrecht zu stellen. Wenn wir z. B. bei Culex-Larven die Aufnahme von Luft in die Tracheen verfolgen wollen, so gelingt dies nur, wenn wir die Tiere in ein kleines Aquarium einschließen, auf das wir das Mikroskop horizontal richten können, da die Larven während dieses Vorganges senkrecht unter der Wasseroberfläche hängen. Man wird sich zu solchen Untersuchungen leicht ein kleines Aquarium aus Deckgläschen herstellen können, die man mit Kanadabalsam, Wasserglas, Syndetikon oder Plastilina miteinander verkittet. Bei sehr kleinen Tieren wende man das von Schaudinn empfohlene Mikro-Aquarium an. An der Längsseite eines Objektträgers wird ein Ausschnitt angebracht von der Größe, in der man den Behälter wünscht. Kittet man nun auf beiden Seiten mit Kanadabalsam ein Deckgläschen auf, so ist das Aquarium bereits fertig. Obwohl dieser Behälter seitlich offen ist, so kann er doch wie ein gewöhnlicher Objektträger auch auf den horizontalen Objekttisch aufgelegt werden, da das enge Lumen wie eine Kapillare das Wasser festhält. Zur Durchlüftung können Algen verwendet werden oder man leitet mit einem Wollfaden frisches Wasser zu.

Die mikroskopische Untersuchung von lebenden Lufttieren (= Tiere, die in Luft untersucht werden müssen) wird nur selten vorteilhaft sein, da die durch das Landleben bedingte, stärkere äußere Schutzhülle die Tiere meist völlig undurchsichtig macht. Dagegen wird es oft nötig sein, diese Objekte in auffallendem Licht unter der Lupe zu betrachten. Beim Fesseln von Insekten und Spinnen genügt es bisweilen, die Beine mit irgendeinem Kitt festzukleben.

Soll der Kopf eines Insekts ruhig gestellt werden, so wird man vorteilhaft auch die Fühler straff angespannt mit dem Kitt belegen. Plastilina und Wachs haben hier den Vorzug, daß die Tiere nachher nicht unter den noch anklebenden Teilchen zu leiden haben. Kommt es darauf an, durchsichtigere Körperanhänge der Insekten oder Spinnen zu untersuchen, so kann man die lebenden Tiere auch für kurze Zeit in Öl bringen, um die störend hohe Brechungsdifferenz des Chitins gegenüber der Luft zu beseitigen. Auch vertragen die Eier und Embryonen mancher Insekten und Arachniden einen kürzeren Aufenthalt in Öl; man hat nur darauf zu achten, daß das Öl nicht tiefer eindringt. Es gibt Eier und Embryonen, die überhaupt keine besondere Maßnahmen erfordern. So können Ascaris-Embryonen einfach trocken auf einen Objektträger gebracht werden, wo sie sich je nach der herrschenden Temperatur schnell oder langsam weiterentwickeln. Wünscht man die Beobachtung auszusetzen, so bringt man den Objektträger in Kälte, und wird dann die Embryonen nach Tagen noch auf demselben Stadium finden, auf dem man sie verlassen hat. In die Wärme gebracht, setzt alsbald die Entwicklung von neuem ein.

Über Färbung intra vitam siehe S. 112.

Die Wirkung des Wimperschlags bei Protozoen und Rotatorien ist ohne besondere Maßnahmen meist nicht deutlich zu erkennen. Ist das Wasser, in dem untersucht wird, sehr reich an Bakterien, die durch den Strudel, den die Wimpern erzeugen, mitgerissen werden, so kann dies das Studium schon sehr unterstützen. Fehlen diese, so hilft man sich in der Weise, daß man dem Wasser unlösliche und leicht erkennbare, d. h. farbige Partikelchen beimengt, die für die zu untersuchenden Tiere unschädlich sind. Am geeignetsten ist hierfür fein zerriebenes Karmin (löst sich in dest. Wasser nur in Spuren), Tusche oder Indigo. Dabei wird nicht nur die Richtung des Wasserstrudels, sondern oft auch der Vorgang der Nahrungsaufnahme usw. sehr

schön demonstriert. Da bei Protozoen, Turbellarien, Rotatorien u. a. die unschädlichen Farbkörnchen wie Nahrungspartikelchen der Mundöffnung zugeführt und aufgenommen werden, um schließlich wieder mit Nahrungsresten den Körper zu verlassen, so kann man durch die zu jeder Zeit leicht erkennbaren Farbstoff-Partikelchen den ganzen Prozeß der Nahrungsaufnahme und Abgabe leicht verfolgen.

Es ist hier der Ort, noch auf einige Hilfsgriffe hinzuweisen, die zwar bei Beobachtung des lebenden Tieres angewandt werden, die aber das Absterben der betreffenden Tiere zur Folge haben. So bedient man sich bei Protozoen eines minimalen Zusatzes von Essigsäure zum Wasser, um ihre Kerne durch Quellen deutlicher sichtbar zu machen. Doch nehme man nicht so viel, daß der Körper der Tiere gleich zu platzen beginnt. Die Geißeln der Flagellaten usw. treten sehr deutlich hervor, wenn man dem Wasser etwas Jodtinktur zusetzt.

Bei den Coelenteraten erreicht man durch vorsichtige Beimengung von Essigsäure ein Explodieren vieler Nesselzellen.

Um die ersten Entwicklungsstadien von Eiern zu erhalten, bedient man sich häufig der künstlichen Befruchtung. Bei den wirbellosen Wassertieren und auch bei Lufttieren gelingt es in manchen Fällen ohne Schwierigkeit, das Sperma mit den Eiern in der erforderlichen Weise zusammenzubringen. Meist genügt es, den Eiern die zerstückelten Vasa deferentia und Hoden beizumengen. Bei Knochenfischen werden zunächst dem Weibchen die Eier durch leichten Druck auf den Bauch ausgestrichen; dann wird der in gleicher Weise ausgedrückte Samen darübergegossen, nun etwas Wasser hinzugegeben und nach wenigen Minuten, wenn das Eindringen der Spermatozoen erfolgt ist, bringt man dann die Eier in fließendes Wasser. Bei Echinodermen ist auf genügende Verdünnung des Spermas durch Seewasser (ein kleiner Tropfen auf ein Urgläschen) zu achten, bevor es den Eiern zugesetzt wird, da sonst häufig Polyspermie eintritt. Auch sollen die

Eier nicht in gedrängter Schicht den Boden des Schälchens bedecken.

Das Operieren von kleinen Metazoen und von Protozoen geschieht am besten in Kirschgummilösung oder in einer 3 %igen Lösung von Gelatine, die dem gleichen Volum Wasser, in dem sich die Tiere befinden, zugefügt wird; auch Quittenschleim ist brauchbar. Die Vorteile, die diese Methode gegenüber der Betäubung bietet, liegen auf der Hand.

Bei Untersuchung überlebender Gewebe oder freier Zellen hat man auf die Temperatur zu achten, unter der sich die Gewebe normal befinden. Schwieriger als das Erzielen der richtigen Temperatur ist es, ein geeignetes Milieu zu schaffen, das einerseits durchsichtig genug ist, um die Untersuchung nicht zu behindern, andrerseits dem Gewebe möglichst günstige Lebensbedingungen bietet. Hierfür könnten die Gewebesäfte und das Blutserum in Betracht kommen, doch neigen sie beide sehr zum Gerinnen. Untersucht man in Wasser, so hat man diesem so viel Salz zuzusetzen, bis die Lösung mit dem Gewebe isotonisch ist. Denn es kommt darauf an, die abnormalen, für das lebende Plasma verderblichen Diffussionsströmungen zu vermeiden. Am verbreitetsten ist die Anwendung der sog. physiologischen Kochsalzlösung. Sie ist 0,75 %ig; doch erfordern viele Gewebe eine stärkere Konzentration (0,9 bis 1,1 %). Bei Haien und bei wirbellosen Meerestieren wird Meerwasser angewandt, oder eine physiologische Kochsalzlösung, deren osmotischer Druck gleich ist dem des Meerwassers. Auch eine 1—10 %ige Lösung von Chlormangan in destilliertem Wasser wird empfohlen.

Von den Körpersäften werden am besten angewandt: Humor aqueus oder Amnionwasser. Beiden wird, um die Zersetzung zu verhüten, Jod zugefügt, das in geringer Menge in Lösung geht. Auch Hühnereiweiß, filtriert, und mit 9 Teilen physiol. Kochsalzlösung vermischt, ist

brauchbar. Ebenso eine Lösung von Zucker in gleichem Gewicht Wasser. Die Gewebsteile werden gewonnen durch Abschaben, durch feines Zerschneiden oder dadurch, daß man das betreffende Organ gegen ein großlöcheriges Sieb andrückt und nun mit einem Rasiermesser an der freien Wand herabfährt. Dabei werden von dem durch die Öffnungen gepreßten Gewebe jeweils kleine Fetzchen abgeschnitten.

Macerieren.

In früherer Zeit, als die Technik des Schneidens noch nicht so weit ausgebildet war, wie heutigen Tages, spielte die Beobachtung der künstlich isolierten Gewebselemente eine wichtige Rolle. Heute dagegen wird sie über Gebühr vernachlässigt. Häufig gelingt es auch mit den besten Schnitten nicht, Klarheit zu gewinnen über die Gestalt einzelner Zellen. Ist ein Organ aus zahlreichen differenten Zellen zusammengesetzt (z. B. Retina), so ist der Nachweis der einzelnen Elemente oft nur durch Isolation zu erbringen. Auch die Isolierung einzelner Zellgruppen (Harnkanälchen etc.) kann das Studium eines Organs oft schon sehr erleichtern. Die primitivste Art, die zelligen Elemente voneinander zu trennen, ist das Zerzupfen der Gewebe. Da aber der Zellinhalt meist viel weniger resistent ist, als die die Zellen miteinander verbindende Kittsubstanz, so wird in der Hauptsache das Gegenteil von dem erreicht, was beabsichtigt ist: es zerreißen die Zellen und die Zwischensubstanz bleibt erhalten. Allerdings findet sich unter der Trümmermasse auch dann und wann ein brauchbares Bild.

Man war daher von jeher darauf bedacht, die Gewebe Bedingungen auszusetzen, die zu einer Auflösung der Kittsubstanz und zugleich zu einer Härtung des Zellinhalts führen. Doch ist ein erfolgreiches Macerieren auch möglich, ohne daß der Zellinhalt gehärtet wird. Über das Härten siehe bei „Fixieren“.

Fast alle Flüssigkeiten, die sich zum Fixieren eignen, können auch zum Macerieren verwandt werden. Bei manchen ist nur eine längere Einwirkung nötig, und die Auflösung der Kittsubstanz macht sich bemerkbar. Bei den meisten ist es eine verdünntere oder konzentriertere Lösung, die dann neben der fixierenden auch eine macerierende Wirkung zeigt. Es weist uns dies darauf hin, wie wichtig bei den verschiedenen Fixationsmedien der Grad der Konzentration ist. Auch reines Wasser kalt, warm oder kochend angewandt, kann in einigen Tagen eine macerierende Wirkung ausüben. Für einige Gewebe (Darmepithel) genügt es auch, das Eintreten der ersten Fäulnisprozesse abzuwarten, um brauchbare Macerationspräparate zu erhalten.

Die in einer der nachstehenden Flüssigkeiten behandelten Gewebe werden entweder zerzupft, oder besser unter ein Deckglas mit Wachs- oder Plastilinafüßchen gebracht; dann wird mit einem leichten Instrument auf das Deckglas geklopft, bis die Elemente genügend isoliert sind. Auch empfiehlt es sich, die macerierten Objekte in einem Reagenzgläschen mit wenig Flüssigkeit tüchtig umzuschütteln. Mit einer Pipette bringt man dann Proben des zu Boden sinkenden Satzes auf den Objektträger. Gefärbt wird meist n a c h dem Macerieren; doch gestatten auch einige Macerationsflüssigkeiten (wie Alkohol) den Zusatz von Farben. Dauerpräparate können in der üblichen Weise hergestellt werden.

Der Erhaltungszustand der Zellen ist nach der Maceration meist nicht mehr so gut, wie in fixiertem Material. Denn das Quellen der Gewebe ist ein Faktor, der die Isolierung wesentlich erleichtert und insofern erwünscht und erstrebenswert ist. Andrerseits leiden hierdurch aber auch die Zellen und verändern ihre Form. Dennoch ist uns in dem Macerieren ein wichtiges Hilfsmittel an die Hand gegeben, das oft gestattet Fragen zu lösen, auf die uns Schnittpräparate keine präzise Antwort geben.

Die einzelnen Macerationsflüssigkeiten folgen hier in einer Anordnung, die lediglich auf ihre chemische Natur Rücksicht nimmt. Ihr Anwendungsbereich ist jeweils beigefügt. Doch soll damit nicht gesagt sein, daß sich damit nicht auch bei anderen Geweben dann und wann gute Resultate erzielen lassen.

Kalilauge, konzentriert, 30—40%ig. ½—3 Stunden Einwirkungsdauer, für Bindegewebe und Muskel. In größerer Verdünnung löst sie organische Substanz.

Salpetersäure: konzentriert läßt man sie etwa 4 Stunden auf Muskelfasern einwirken. Auch zur Isolierung von Harnkanälchen empfohlen. Nachher in 2 Teile Glyzerin und 1 Teil Wasser.

40%ige, rauchende. Zur Isolation von Harnkanälchen 2—4 Stunden.

3%ig, für zarte Gewebe. Nach ¼ Stunde kommen die Objekte auf 1 Stunde in 25%igen Alkohol.

Salpetersäure (15 Teile) — Eisessig (15 Teile) — Glyzerin (100 Teile) — Alkohol von 50% (200 Teile). Für Nerven von Hirudineen. 1 Tag in dieser Flüssigkeit in ausgespanntem Zustande, dann 1 Tag in 70%igen Alkohol, worin starke Quellung auftritt, dann 50%iges Glyzerin, das zu wechseln ist, bis es nicht mehr sauer reagiert.

Salpetersäure-Kaliumchlorat. Man gießt zu dem Kaliumchlorat das 4fache Volumen Salpetersäure. Muskel wird darin in ½ Stunde maceriert.

Salzsäure-Alkohol. 90%iger Alkohol + 0,5% konzentrierter Salzsäure. Die Objekte werden darin einige Stunden lang gekocht.

Schwefelsäure, konzentriert, kalt oder erwärmt. Angewandt für verhorntes Gewebe. (Nägel, Haare, Epidermis).

Chromsäure 0,01—0,04 g auf 100 cm^3 Wasser. Für die verschiedensten Gewebe (Nerven, Muskeln) von Kaltblütern mit gutem Erfolg angewandt. Dauer der Einwirkung 1 bis 3 Tage oder länger. Zu kleine Dimensionen des Präparates sind eher nachteilig.

0,1 %ige Chromsäure wird für Drüsenzellen und zur Isolation des Achsenzylinders der Nerven empfohlen. Einwirkungsdauer bis zu 8 Tagen.

Osmiumsäure 0,1 %ig. Auf Retinastücke läßt man 1/4—24 Stunden lang einwirken. Auf Nervenzellen 14 Tage lange Einwirkung.

Osmium-Essigsäure 0,05 %ige Osmiumsäure 1 Teil, 0,2 %ige Essigsäure 1 Teil. Medusen verbleiben in diesem Gemisch 2—3 Minuten. Aktinien 5—10 Minuten. Dann wird die Osmiumsäure in 0,1 %iger Essigsäure 1 Tag lang ausgewaschen, dann Wasser.

Wasserstoffsuperoxyd, käufliche Lösung. Für Haut. Dauer der Einwirkung 1 Tag oder mehr.

Jod-Serum, dargestellt aus Amnionwasser (von der Kuh oder vom Schaf), das mit reiner Jodtinktur gemischt und dann filtriert wird. Von dieser Lösung gießt man dem zum Gebrauch bestimmten Serum etwas zu. Die Präparate dürfen nicht zu groß sein. Sie bleiben in verschlossenem Glas 1 Tag oder länger in dieser Flüssigkeit. Nur für frische Gewebe.

Salpetersaures Natron, 10 %ig. Für Epithelien. Einwirkungsdauer mehrere Tage.

Kochsalz, konzentrierte Lösung. Gibt bei mehrtägiger Einwirkung brauchbare Maceration von Epidermis.

Chloralhydrat, 2—5 %ig. Besonders nach Fixieren mit 1/4 %iger Osmiumsäure für Gehirn, Retina der Arthropoden, Muskel u. a.

Kohlensaures Kali oder Natron; 10 g in 100 ccm 25 %igem Alkohol. Man läßt das Gemisch bei 40° 1—2 Tage lang einwirken. Für die Epidermis sehr gelobt.

Kohlensaures Ammoniak, gesättigt. Für Sarkolemm. Einwirkungsdauer 3—5 Minuten.

Müllers Gemisch (siehe Fixieren), Kaliumbichromat 2 g, Natriumsulfat 1 g, Wasser 100 ccm. Für verschiedene Gewebe mit gutem Erfolg anwendbar. Die Einwirkungsdauer beträgt meist mehrere Wochen.

10 % ige Lösung von Müllers Gemisch wird für Epithelien empfohlen. Man läßt einige Stunden bis einige Tage einwirken.

Chromsaures Ammoniak (Landois' Gemisch). Je 5 Teile einer gesättigten Lösung von Kaliumphosphat, Natriumsulfat und doppelchromsaurem Ammonium. Hierzu 100 Teile Wasser. Kleine Stücke bleiben 1—5 Tage darin und werden dann in ein Gemisch übertragen, das zu gleichen Teilen aus obiger Flüssigkeit und Karminammoniaklösung besteht. Auswaschen und zerzupfen in Glyzerin. Besonders für das Zentralnervensystem empfohlen.

Alkohol 30 %ig, sogenannter Ranvier'scher oder Drittel-Alkohol; vielfach angewandt und bei frischem Gewebe (z. B. Darmepithelzellen) sehr zu empfehlen. Dauer der Einwirkung ½—1 Tag oder länger.

Alkohol 20 bis 25 %ig, wie 30 %iger. Gibt auch noch nach wochenlanger Einwirkung brauchbare Präparate.

Eisessig-Glyzerinwasser (Haller's Gemisch). Eisessig 25, Glyzerin 25, destilliertes Wasser 100 Teile. Maceriert Sinnesepithelien schon in ½ Stunde.

Pikrinsäure. Zu 30 ccm destillierten Wassers werden 10—20 Tropfen einer gesättigten Pikrinsäure-Lösung zugefügt. Für Epithel und Drüsen 4—8 Stunden, für Nervensystem 12—24 Stunden.

Gerbsäure 0,5—1,5 %ig. Einwirkungsdauer 1—2 Tage. Für Muskeln und Sehnen sehr gelobt.

Methylalkoholgemisch; 10 Teile Glyzerin, 1 Teil Methylalkohol, 20 Teile destilliertes Wasser. Für die Retina empfohlen.

Maceration durch verdauende Fermente.

Angewendet werden hauptsächlich Pepsin und die Pankreas-Enzyme. Das Pepsin gewinnt man entweder nach der Operationsmethode von Pawlow durch die Magenfistel oder man bereitet sich aus frischem Magen einen Glyzerin-

extrakt (1 Teil) und setzt diesem 3 Teile einer $^1/_5$%igen Salzsäure und etwas Thymol zu. Auch sind im Handel entsprechende Präparate zu bekommen. Man maceriert bei 37 ^{0} (im Thermostat) 1 bis 3 Stunden. Für elastische Fasern zu empfehlen. Handelt es sich darum, nicht die einzelnen Zellen, sondern Zellbestandteile (Nukleïne) zu untersuchen, so läßt man die Verdauung weiter fortschreiten (Maximale Verdauung, im Gegensatz zu der unterbrochenen sog. fraktionierten Verdauung).

Die Macerationswirkung des Pankreatins (käuflich bei Witte, Rostock) ist in der Hauptsache dem eiweißverdauenden Trypsin zuzuschreiben. Für Bindegewebe zu empfehlen, das entweder frisch oder in Alkohol fixiert ist. Es wird einige Stunden in eine gesättigte, filtrierte Lösung von Pankreatin bei Körpertemperatur eingelegt.

Korrodieren.

Um Skelettelemente oder Ausgüsse von Kanalsystemen (mit Woodschem Metall oder dergl.) von den Weichteilen zu befreien, bedient man sich folgender Mittel:

Kalilauge oder Natronlauge. Die Objekte (Arthropoden, Schwämme, Echinodermen usw.) werden in verdünnter Lösung gekocht oder längere Zeit darin gelassen. Greift Kalknadeln etwas an.

Eau de Javelle (Kaliumhypochlorit und Chlorkalium) und Eau de Labarraque (Natriumhypochlorit und Chlornatrium). Um Präparate von Schwamm- oder Holothurien-Skelettelementen zu erhalten, bringt man auf dem Objektträger das Objekt ¼ bis 1 Stunde in Eau de Javelle oder Labarraque von der käuflichen Konzentration. Auch zum Erweichen des Chitins der Arthropoden leisten beide Flüssigkeiten gute Dienste. Sollen die Weichteile dabei geschützt werden, so bettet man das Objekt zunächst in weiches Paraffin ein. Dabei ist jedoch zu beachten, daß das Objekt nur solange im Ofen bleibt, wie nötig

ist, um die Weichteile mit Paraffin zu durchtränken. Entfernt man dann von dem eingebetteten Stück das Paraffin, das dem Chitin außen aufsitzt, so kann das Eau de Javelle jetzt nur das Chitin angreifen, da hier das Paraffin noch nicht eingedrungen ist, die Gewebe dagegen sind vollständig geschützt. Um eine sicherere Kontrolle darüber zu ermöglichen, wann das Chitin zum Schneiden weich genug ist, wendet man die käufliche Flüssigkeit etwa auf $^1/_5$ verdünnt an. Puppen, die angeschnitten werden mußten, um der Fixationsflüssigkeit den Eintritt zu gestatten, kann man durch Eintauchen der Schnittfläche in flüssiges Paraffin vor dem Eindringen des Eau de Javelle ins Innere schützen.

Auch beim Fixieren von Amphibieneiern, die schwer aus der Gallerthülle frei zu präparieren sind, läßt man auf diese am besten Eau de Javelle einwirken, bis dann das Ei samt der noch bleibenden dünnen Haut fixiert werden kann.

Entkalken.

Alle Fixationsgemische, die Säuren enthalten, entkalken. Doch darf man sich nur bei sehr kleinen Objekten auf ihre Wirkung allein verlassen (kleine Krebse etc.). Zu vermeiden sind bei kalkhaltigen Objekten alle Schwefelsäure-Gemische wegen der Bildung des unlöslichen Gipses. Handelt es sich darum, größere Kalkmengen zu entfernen so bedarf es einer besonderen Behandlung des Objekts mit Säure. Da aber Säuren meist Quellung verursachen (nicht Chromsäure und Salpetersäure) und besonders bei dem in den Knochen stark vertretenen kollagenen Gewebe, so ist es nötig, mit der Säure ein Agens einwirken zu lassen, das für sich allein angewendet, dazu neigt, Schrumpfung zu erzeugen. Die Quellung wird schon vermieden, wenn man in ziemlich hochprozentigem (80—90%) Alkohol entkalkt. Da außerdem alle Säuren bei längerer Einwirkung die Gewebe mehr oder weniger angreifen, der Entkalkungsprozeß aber andrerseits nicht zu sehr beschleunigt

werden darf, so ergibt sich weiter die Forderung, daß sich die zu entkalkenden Gewebe bereits in gut gehärtetem Zustand befinden müssen. Nach der Entkalkung werden die Objekte gründlich ausgewaschen, da zurückbleibende Säure die Färbbarkeit beeinträchtigt. Bei größeren Objekten (Echinodermen, kleinere Schädel etc.) verfährt man am schonendsten in der Weise, daß man zunächst in Zelloidin einbettet, und dann den gehärteten Zelloidinblock in etwa 80%igem Alkohol der Säure (Salpetersäure, Trichloressigsäure) aussetzt. Man kann in diesem Falle die Säure wesentlich konzentrierter anwenden (10—50%), ohne daß die Gewebe Schaden nehmen. Alle Entkalkungsflüssigkeiten müssen entsprechend dem Säuregehalt und der Menge des zu lösenden Kalkes besonders im Anfang öfter gewechselt werden, da sie sich verbrauchen und dann leicht Konzentrationen entstehen, die macerierend wirken.

S a l p e t e r s ä u r e. Soll keine Quellung verursachen, wenn in nicht zu schwacher Konzentration (unter 2%) angewandt. Kann daher in wässriger Lösung gebraucht werden. Alkohol verzögert die Wirkung, gestattet aber Benutzung von 10 bis 50% der gew. (25%igen) Salpetersäure (Spez. Gewicht 1,4), besonders wenn die Objekte in Zelloidin eingeschlossen sind. Doch ist 5% Salpetersäure in 90%igem Alkohol wohl am meisten zu empfehlen. (Öfters wechseln.)

Da die schädliche Wirkung stark verdünnter wässriger Salpetersäure sich auch beim Auswaschen einer hochprozentigen Salpetersäure bemerkbar machen würde, so darf nicht in Wasser ausgewaschen werden, sondern die Objekte sind zunächst einen Tag in eine 5%ige Alaunlösung zu bringen. Meist wird natürlich in 80%igem Alkohol ausgewaschen.

Um die schädigende Wirkung der Salpetersäure aufzuheben, wird auch P h l o r o g l u c i n in verschiedenen Quantitäten zugesetzt. Z. B. kann man 1 g Phloroglucin und 10 ccm Säure (Salpetersäure oder Salzsäure) in 100 ccm warmem

Wasser lösen und nach dem Abkühlen 200 ccm 70%igen Alkohol hinzufügen. Entkalkt langsam. Öfter wechseln. Auswaschen in Alkohol.

Schweflige Säure in gesättigter (5 %) wässriger Lösung. Entkalkt schnell und schonend nach Formolfixation. Nicht zu empfehlen nach Sublimat und Osmiumgemischen. Auswaschen in Wasser in einem Tag.

Trichloressigsäure 5%ige wässrige Lösung. Häufig wechseln. Auswaschen ein bis mehrere Tage in Wasser (Zelloidinblöcke entkalke man in 85%igem Alkohol mit 10 % Säure).

Chromsäure. Sie kann in $^1/_5$ bis 2%iger Lösung zum Entkalken Verwendung finden. Einwirkungsdauer mehrere Tage.

Chromosmiumessigsäure = Flemmings Gemisch. (Siehe S. 38.) Wirkt besonders durch die Essigsäure. Entkalkt langsam, ist aber dennoch empfehlenswert, da auch eine monatelange Einwirkung nicht schadet. Öfter wechseln.

Entkieseln.

Für das Entkieseln kommt nur Flußsäure oder Fluornatrium mit Salzsäure in Betracht. Bei beiden ist eine Schrumpfung nicht zu vermeiden. Man schließt daher die Objekte am besten vorher in Zelloidin ein, und bringt sie dann für 1 bis 2 Tage in ein Gemisch von 100 Teilen Alkohol 90%, und 20 Teile Flußsäure. Öfter umschütteln. Gründliches Auswaschen in 80—90%igem Alkohol. Objekte, die nicht in Zelloidin eingebettet sind, kommen in Alkohol, dem tropfenweise Flußsäure zugesetzt wird. Für kleine Objekte empfiehlt sich die angenehmer zu handhabende Lösung von Fluornatrium, der Salzsäure zugesetzt wird.

Die Gläser müssen innen mit Paraffin überzogen werden, um sie vor der Einwirkung der Flußsäure zu schützen. Auch ist zu beachten, daß die Dämpfe der Säure die Schleimhäute stark reizen.

Bleichen.

Pigmente können entfernt werden durch oxydierende und durch reduzierende Mittel, oder durch Lösungsmittel. Von den erstgenannten ist Chlor in statu nascendi an erster Stelle anzuführen. Die Objekte oder (bei Schnitten) die Objektträger werden in ein Gefäß mit 70%igem Alkohol gebracht, in dem sich einige Kristalle Kaliumchlorat befinden. Dann läßt man mit Hilfe einer Pipette etwas Salzsäure direkt auf das Kaliumchlorat fließen. Die Objekte können tagelang auf diese Weise dem Chlor ausgesetzt werden. Ist das Pigment zu widerstandsfähig, so kann man etwas erwärmen. Häufig führt aber auch dies noch nicht zum Ziel, und dann müssen energischere Methoden Anwendung finden (Augenpigment der Arthropoden). Eau de Javelle und Eau de Labbaraque (verdünnen!) wirken gleichfalls durch Chlorentwicklung. Zum Bleichen des Chitins sind sie häufig vorzuziehen, da sie dieses zugleich erweichen. (Über Bleichen von Objekten, die durch Osmium geschwärzt wurden, siehe S. 37).

Wasserstoffsuperoxyd in 3—10%iger Lösung, wirkt nicht intensiv, maceriert aber bei längerer Einwirkung. Magnesiumhyperoxyd bleicht langsam. Anwendung wie bei Erzeugen von Chlor.

Natriumperborat. Konzentrierte d. h. 2,5%ige (bei 30—35° 5%) Lösung wirkt sehr energisch, doch ohne den Objekten zu schaden und die Färbbarkeit zu beeinträchtigen. Ein Zusatz von wenig Citronen- oder Weinsäure, der bei Lösung des Borates in 50—70% Alkohol unentbehrlich ist, verstärkt die Wirkung außerordentlich.

Von reduzierenden Mitteln ist nur die schweflige Säure in alkoholischer Lösung in Gebrauch.

Von Lösungsmitteln für Pigment kommt hauptsächlich Salzsäure, Salpetersäure und Natronlauge meist in alkoholischer Lösung in Betracht. Salzsäure und Salpetersäure bieten beim Augenpigment der Arthropoden oft die

einzige Möglichkeit, das Pigment zu entfernen. Häufig (Spinnen) muß man sie in starker Konzentration anwenden, um zum Ziel zu gelangen. Doch nehmen gut aufgeklebte Schnitte dabei keinen nennenswerten Schaden. Auch warme Gemische von Glyzerin (33 Teile), 80 %igem Alkohol (67 Teile) und Salpetersäure (2 Teile) sind empfehlenswert.

Fixieren und Härten.

Allgemeines.

Nur wenige Objekte sind so klein und durchsichtig, daß sie im lebenden Zustande eine eingehende Untersuchung gestatten. Meist handelt es sich um größere, undurchsichtige Tiere oder um Organe, deren histologisches Studium ein Zerlegen in feine Schnitte, mithin auch ein Abtöten des Objektes erfordert. Aber auch da, wo die Bedingungen für die Untersuchung am Lebenden günstig sind, wird das Studium des gefärbten Tieres in toto wertvolle Vertiefungen der Erkenntnis bieten. Da aber die vitale Färbung sowohl hinsichtlich der verwendbaren Farben als auch hinsichtlich der distinkt färbbaren Organe eine beschränkte ist, so wird auch dann spätere Untersuchung am toten Objekt vorteilhaft sein.

Mit dem Abtöten ist aber eine wichtige Forderung verknüpft: das Gewebe soll nachher bis in die feinsten Details noch dieselben Formen zeigen wie im lebenden Zustande, es muß „fixiert" werden. Ferner muß das Objekt, das geschnitten werden soll, eine hierfür geeignete Konsistenz erhalten. Beides wird — wenn wir von der Gefriermethode zunächst absehen wollen — durch Gerinnen des Eiweißes erreicht.

Die Schnelligkeit, mit der ein Reagenz die Fällung herbeiführt, sagt nichts aus über seine Güte als Fixierer. Die Erfahrung hat gelehrt, daß solche Gemische von Reagentien die besten Resultate liefern, deren eine Komponente — eine Säure — ein rasches Abtöten der Zelle herbeiführt und die

Fällung einleitet, die nun erst durch das andere, weniger rapid eindringende Reagenz vollständig durchgeführt wird. Als eine besonders schnell abtötende und daher sehr häufig gebrauchte Säure ist die Essigsäure zu erwähnen.

Die totale Gerinnung des Eiweißes kann identisch sein mit der Härtung. Im allgemeinen jedoch hat die Resistenz der Objekte noch durch vorsichtiges Entziehen von Wasser in Alkohol eine Steigerung zu erfahren. Dies wird am wenigsten dann erforderlich sein, wenn der Fixierer mit dem Eiweiß eine chemische Verbindung eingegangen ist (Osmiums. Chroms). Solche Objekte sind widerstandsfähig genug, um ohne Gefahr der Schrumpfung in höheren Alkohol gebracht werden zu können.

Das Eingehen chemischer Reaktionen mit dem Eiweiß ist durchaus nicht Bedingung für einen guten Fixierer. Wichtig ist nur, daß er ein rapides Abtöten und eine schnelle aber dennoch mäßig einsetzende Gerinnung herbeiführt. Er darf nicht lösend wirken; daher sind Alkalien und Säuren in stärkerer Konzentration zu vermeiden.

Wir haben hier das „rapide" Abtöten als eine wichtige Forderung aufgestellt, weil dies der allgemeinen Auffassung entspricht. Wir selbst haben beobachtet, daß man die günstigsten Resultate erzielt, wenn man die zu fixierenden Tiere vorher stark betäubt. Merkwürdigerweise erhält man sogar oft hervorragend gute Ergebnisse, wenn man die Tiere oder Gewebsstücke erst langsam absterben läßt und dann erst fixiert. Die günstigen Resultate, die damit erzielt werden, scheinen dadurch bedingt zu sein, daß bei derartig vorbehandelten Geweben die Zellen nicht mehr imstande sind, dem Eindringen der Flüssigkeit Widerstand entgegenzusetzen, da dieser in der Hauptsache an die Lebensäußerungen gebunden ist. Der Fixierer dringt infolgedessen schnell und gleichmäßig aber nicht stürmisch ein. Bei frischem Gewebe jedoch müssen die osmotischen Druckdifferenzen vielleicht erst einen bedeutenden Grad erreichen, bevor sie den Wider-

stand, den die Zelle dem eindringenden Fixierer setzt, überwinden. Dadurch erhält hier das Eindringen etwas Stürmisches, Explosionsartiges, das nach unseren Erfahrungen nicht das Erstrebenswerte ist.

Eine Gruppierung der Fixationsgemische nach ihrer Wirkungsweise vermag dem Anfänger die Übersicht über die zahllosen Gemische zu erleichtern, wenn es auch nicht möglich ist von diesem einen Gesichtspunkt aus zu einer befriedigenden Einteilung zu gelangen.

Wir können gruppieren in:

1. Osmium-Essigsäure-Kombinationen; gehen chemische Verbindungen mit dem Eiweiß ein und wirken dabei teilweise optisch differenzierend und bräunend (Fett!). Färbung in vieler Hinsicht erschwert.
2. Chrom-Essigsäure-Kombinationen; Färbung weniger erschwert als bei 1.
3. Metallsalze-Essigsäure-Kombinationen (Sublimat etc.).
4. Pikrinsäure-Kombinationen.
5. Alkohol-Essigsäure-Kombinationen.
6. Formol-Essigsäure-Kombinationen.
7. Heißes Wasser.

Nach Verwendung von 3 bis 7 besteht ausgedehnte Färbbarkeit der Objekte, wenn die überschüssige Fixierungsflüssigkeit sorgfältig entfernt ist. Durch das Fixieren wird nichts optisch differenziert.

Ein und derselbe Fixierer ist weder für die verschiedenen Gewebe desselben Tieres, noch für die gleichen Gewebe verschiedener Tiere in gleichem Maße günstig. Es muß daher meist von Fall zu Fall erprobt werden, welche Kombinationen die besten Resultate liefern. Mit Bestimmtheit voraussagen läßt sich darüber nichts.

Die Dauer des Fixierungsprozesses hängt ab von der Geschwindigkeit, mit der das Reagenz eindringt, und von der Größe des Objekts. Wird hierdurch eine bestimmte Minimalzeit gefordert, so läßt sich andrerseits

eine Maximalzeit nicht absolut festsetzen. Wenn auch im allgemeinen ein guter Fixierer das fixierte Objekt für einige Zeit gut konserviert, so ist doch bei Gebrauch der meisten Reagentien ein dauerndes Belassen in ihnen nicht zu empfehlen.

Die Menge der zu verwendenden Flüssigkeit hängt von der Größe des Objektes ab. Sie hat das Objekt mehrmals an Volumen zu übertreffen.

Der Überführung in andere Medien, wie sie die Weiterbehandlung fordert, geht zumeist ein gründliches Auswaschen des Fixierers voraus. Es kann dies in Wasser geschehen, wenn die Härtung schon durch den Fixierungsprozeß einen hohen Grad erreicht hat und wenn sich hierbei nicht vorher entstandene Verbindungen, die den Härtegrad bedingen, wieder lösen. Ist dies letztere der Fall, wie nach der Pikrinsäurefixierung, oder ist eine Nachhärtung erforderlich, so muß mit Alkohol ausgewaschen werden.

Das Fixieren von Seetieren erfordert eine gesonderte Besprechung, da hier die Salze, die im Meerwasser enthalten sind, meist berücksichtigt werden müssen. Damit diese sich nicht beim Fixieren als Kruste auf den Objekten niederschlagen und so das weitere Eindringen verhindern, hat man, falls sich das Objekt nicht einfach gründlich abspülen läßt, womöglich solche Reagentien zu wählen, in denen die Meersalze nicht ausfallen, wie z. B. Pikrinsäure. Alkohol muß angesäuert werden. Das Auswaschen hat in niederem, die Salze noch in Lösung haltenden Alkohol zu erfolgen, besonders dann, wenn ein in Meerwasser gelöster Fixierer zur Verwendung kam.

Schließlich muß noch die Methode, das Objekt gefrieren zu lassen, Erwähnung finden. Sie gestattet eine Härtung ohne Eiweißgerinnung, oft sogar ohne Abtötung. Ihre Anwendung ermöglicht es, in kürzester Zeit ein Gewebe in Schnitte zu zerlegen. Sie kommt daher in erster Linie für den Chirurgen und auch für den Pathologen in Betracht.

Doch auch sonst bietet die Vermeidung der Eiweißfällung, sowie die Möglichkeit, die Objekte am Leben zu erhalten, genügend Vorteile, um dieser Methode auch in Kreisen der Biologen eine allgemeinere Verwendung, besonders zur Kontrolle der auf anderem Wege gewonnenen Resultate zu sichern.

Fixieren stark kontraktiler Objekte. Bei kleinen Tieren wird das Fixieren der Gewebe durch Fixieren des ganzen Tieres erfolgen. Da aber jedes Tier auf starke Reize mit Muskelkontraktionen antwortet, so ist es erforderlich, bei den Tieren, deren Kontraktilität des ganzen Körpers besonders stark entwickelt ist (Protozoen, Coelenteraten, Mollusken) besondere Maßnahmen zu ergreifen, um während des Fixierens die Organe in ausgestrecktem Zustande zu erhalten.

Zwei Wege stehen uns offen, um dies zu erreichen. Einmal: so plötzliche Abtötung, daß Kontraktionen nicht mehr ausgeführt werden können; oder aber vorherige Lähmung des Tieres.

Schnelles Abtöten. Das erste erreicht man am besten durch Hitze. Temperaturen von 60°—100° bewirken bei kleinen Tieren nicht nur fast momentanes Absterben, sondern sie fixieren auch zugleich. Das Optimum der Temperatur ist für verschiedene Objekte verschieden. Jedenfalls wähle man die Temperatur nicht höher als nötig und lasse die Hitze nicht länger als wenige Sekunden einwirken.

Betäuben. Besser als das Übergießen mit heißem Fixierer, bewährt es sich, die Objekte vorher zu betäuben, da das momentane Abtöten durch Wärme mit einem zu plötzlichen Gerinnen des Eiweißes und infolge davon mit Schrumpfungen oder Quellungen verbunden ist.

Es stehen uns als Betäubungsmittel die verschiedensten Reagentien zur Verfügung. Alle verlangen sie die Beachtung der gleichen Regel: man nehme stets so wenig als eben nötig.

Für Protozoen:

Cocaïn 0,1 ‰; Antipyrin 1 ‰; Strychnin 0,1 ‰.

Für Coelenteraten:

salzsaures Hydroxylamin*); Cocaïn; Menthol; Tabakrauch; CO_2 durch Zusatz von Selterswasser; Chloralhydrat; Chlormagnesium; Magnesiumsulfat mit nachfolgendem Zusatz von Ätherwasser. Ferner eine Mischung von 1 Teil Glyzerin, 2 T. 70 %igen Alkohol und 2 T. Seewasser; sie wird in das Wasser gegossen, in dem sich die Objekte befinden.

Für Echinodermen:

allmählicher Zusatz von konzentrierter Magnesiumsulfatlösung und darauf von Ätherwasser.

Für Würmer:

Chloroform; Chloralhydrat 1‰; Curare 0,2 %, in die Leibeshöhle zu injizieren; Hydroxylamin 0,1 %; Bei kleinen Tieren Einwirkung von Kohlensäure am bequemsten vermittels Selterswasser.

Für Mollusken:

Man erstickt das Tier, indem man es auf 24 Stunden in geringes Quantum abgekochten Wassers bringt; die Wirkung wird beschleunigt durch Zusatz von Hydroxylamin (1 %)*); Alkohol (5‰), oder Chloralhydrat (1—3 %), oder Tabakrauch.

Bei Cephalopoden wendet man subkutane Injektionen von ½ ccm Bromäthyl an.

Fixationsmittel.

Osmiumsäure: OsO_4; farblose, leicht sich verflüchtigende Kristalle. Sie wird angewandt in Lösung und in Dampfform.

Lösung. Die Osmiumsäure löst sich zu 5 % in dest. Wasser. Reduziert und schwärzt sich aber leicht bei Zutritt von Staub am Licht. Sie ist daher in dunklen mit Glasstopfen versehenen Flaschen am besten als 2 %ige Lösung aufzubewahren.

---

*) Bei Verwendung von Hydroxylamin ist darauf zu achten, daß die Lösung mit Soda neutralisiert werden muß. Da es stark reduziert, sind die Objekte vor Nachbehandlung mit reduzierbaren Substanzen (Osmiumsäure, Sublimat, Chromsäure etc.) gut auszuwaschen.

Löst man die Kristalle statt in Wasser in 1 %iger Chromsäure auf, so wird die Haltbarkeit dadurch gesteigert. Denselben Effekt hat Zusatz einiger Tropfen einer 5 %igen Sublimatlösung.

Fixiert wird mit einer 0,5—2 %igen Lösung im Dunkeln. Doch wird reine Osmiumsäure selten angewandt, da sie zu schlecht in die Tiefe dringt. Größere Objekte müssen daher in kleinere Stücke zerschnitten werden, und die Einwirkungsdauer muß bis zu mehreren Tagen betragen. Die äußeren Zellen sind häufig überosmiert, d. h. sie bekommen ein glasiges, homogenes Aussehen.

Dämpfe. Man läßt entweder die Dämpfe der Kristalle oder einer Lösung einwirken. Durch Erwärmen kann die Flüchtigkeit erhöht werden. Die Objekte werden in einer Flasche aufgehängt, die die Kristalle enthält, oder auf einem Kork aufgespannt in verschlossenem Gefäß den Dämpfen ausgesetzt.

Die Osmiumdämpfe fixieren gleichmäßiger als die Lösung. Die Dauer der Einwirkung variiert von einigen Sekunden (bei Strichpräparaten) bis zu mehreren Stunden. Osmiumdampffixierung eignet sich gut für Protozoen, isolierte Zellen, Eiter, Sputum.

Nachbehandlung. Sorgfältiges Auswaschen in fließendem Wasser 1—2 Tage. Das Aufkleben der Schnitte der mit Osmium fixierten Objekte ist erschwert, die Verwendung von Eiweiß-Glyzerin als Klebemittel unbedingt erforderlich.

Je nach ihrem Reduktionsvermögen werden die Gewebe beim Fixieren hellbraun bis schwarz, so daß bisweilen besondere Färbung überflüssig ist. So werden fettartige Körper schwarz osmiert und können als solche leicht erkannt werden. Elastische Fasern und Schleimzellen zeigen eine erhöhte Färbbarkeit gegenüber Hämatoxylin und Anilinfarben. Doch ist man bei Osmiumfixation hinsichtlich der Kernfarben auf nur wenige angewiesen.

Die Bräunung der osmierten Objekte kann abgeschwächt und die Färbbarkeit gebessert werden durch Oxydierung vermittels nascierendem Sauerstoffs oder durch Einwirkung von Chlor, das aus Kaliumchlorat und HCl gewonnen wird (vergl. S. 30). Oxydiert wird durch Behandeln der Objekte mit Terpentinöl in Sonnenlicht oder durch Wasserstoffsuperoxyd. Aus Schnitten läßt sich das Osmium durch Gold verdrängen. Man bringt die Objektträger über Nacht (im Dunkeln) in 1—2 %ige wässerige Goldchloridlösung und nach leichtem Abtupfen in 1 %ige Ameisensäure in nicht zu starkes Sonnenlicht. Die resultierende Purpurfärbung kann in schwachem Alkohol mit 3—5 %igen Jod entfernt und die Färbbarkeit durch längeres Waschen in angesäuertem Alkohol gehoben werden.

Chromsäure: $Cr\,O_3$, rote, in Wasser leicht lösliche und stark hygroskopische Kristalle. Man fixiert einige Stunden in einer $^1/_{10}$—1 %igen Lösung und wäscht sehr sorgfältig in fließendem Wasser oder im Dunkeln mit Alkohol aus. In letzterem Falle entfärbt man die braun oder grün gewordenen Objekte mit salzsaurem Alkohol. Das Plasma wird in reiner Chromsäure meist mangelhaft fixiert.

Das Härten größerer Objekte erfordert Tage und Wochen. Die Flüssigkeit muß sehr reichlich bemessen sein (200 ccm pro 1 ccm Objekt) oder öfter gewechselt werden. Man geht am besten von einer $^1/_5$ %igen Lösung aus und steigt allmählich zu ½ %. Zusatz von wenig Glyzerin verhindert das Brüchigwerden, das sonst die Folge längeren Härtens ist.

Chrom-Essigsäure: Chromsäure 2—2 ½ g, Eisessig 1 ccm, Wasser 1 Liter. Einwirkungsdauer bei kleineren Objekten 1 Tag. Hierauf ebensolange wässern. Das Plasma wird nicht besonders gut fixiert.

Perényis Gemisch: 4 Teile 10 %iger Salpetersäure, 3 Teile starken (90 %igen) Alkohols, 3 Teile ½ %iger Chromsäurelösung. Da sich die Chromsäure mit dem Alkohol

bald zersetzt, so fällt ihre Wirkung bei nicht ganz frischen Gemischen weg.

Flemmings Chrom-Osmium-Essigsäure.

Schwaches Gemisch: Chromsäure 2½ g, Osmiumsäure 1 g, Eisessig 1 ccm, Wasser 1 Liter.

Starkes Gemisch: Chromsäure 1 g, Osmiumsäure ½ g, Eisessig 6 ccm, Wasser 120 ccm. Dieses Gemisch dringt besser ein als das schwache. Wünscht man für kleine zarte Objekte und Aufstrichpräparate ein schwächeres Gemisch, so tut man gut, nicht das „schwache" zu wählen, sondern das starke Gemisch auf die Hälfte, auf das Dreifache, ev. bis auf das Zehnfache zu verdünnen. Eine bisweilen vorteilhafte Modifikation des starken Gemischs enthält statt 4 nur 2 g Osmiumsäure.

Die Objekte bleiben 1 Tag bis mehrere Wochen in der Flüssigkeit. Lichtzutritt schadet nicht; doch nehme man keinen zu alten Fixierer. Die Flüssigkeit braucht das Objekt nur wenigemal an Volumen zu übertreffen. Nur kleine Objekte werden gut fixiert, da die Osmiumsäure schlecht eindringt. Kalkhaltige Teile werden durch das saure Gemisch entkalkt.

Die Nachbehandlung sowie die Reduktion der Osmiumbräunung erfolgt wie beim Fixieren mit Osmiumsäure. Das Auswaschen in fließendem Wasser hat mindestens 24 Stunden zu dauern. Das starke Flemmingsche Gemisch ist besonders empfehlenswert beim Studium des Kerns und des Chromidialapparates.

Platinchlorid-Chromsäure. Merkels Gemisch.

Platinchlorid 1 g (od. 2 g); Chromsäure 1 g (od. 2 g); Wasser 800 ccm. Das stark hygroskopische Platinchlorid — im Handel als Platinchlorwasserstoff H_2PtCl_6 — wird am besten als 10%ige Lösung vorrätig gehalten.

Dringt langsam, ev. erst innerhalb mehrerer Tage ein, fixiert aber besonders zarte Gewebe sehr gut und behindert auch nicht die Färbung. Auswaschen mit 70%igem Alkohol.

Platinchlorid-Osmium-Essigsäure. Hermanns Gemisch.

1%ige Platinchloridlösung 15 Teile, (über Platinchlorid siehe Merkels Gem.); 2%ige Osmiumsäure 4 Teile, oder analog der Modifikation des Flemmingschen Gemisches nur 2 Teile; Eisessig 1 Teil.

Das Gemisch dringt langsam ein, fixiert aber Kern und Plasma sehr gut. Fixationsdauer: Stunden bis Wochen, je nach Objektgröße. Wie bei dem Flemmingschen Gem., so nehme man auch hier keine zu alte Lösung. Das Auswaschen hat sehr sorgfältig in Wasser zu erfolgen, da das überschüssige Platinchlorid die Färbung hindert.

Kaliumbichromat.

Wird zum Härten in 2—5%iger wässriger Lösung verwendet, wobei man mit der 2%igen beginnt und zu der stärkeren ansteigt. Die Flüssigkeit ist öfter zu wechseln, jedenfalls immer dann, wenn Niederschläge sich zeigen. Diese treten in den ersten Tagen sehr bald auf; können aber dadurch, daß man das Objekt ins Dunkle stellt, verzögert werden.

Fixiert Chromatin schlecht, Plasma gut. Wird heute fast nur noch als Härtemittel angewendet. Die Härtung ist der mit Chromsäure vorzuziehen, obwohl sie langsamer fortschreitet. Das Gehirn des Menschen erfordert $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{2}$ Jahr. Die Fixation wird in der Hitze beschleunigt, die Härtung ungünstig beeinflußt. Nachbehandlung wie bei Chromsäure. Das Auswaschen mit Alkohol beeinträchtigt sehr die Färbbarkeit.

Müllersche Flüssigkeit.

Kaliumbichromat 2—2,5 g; Natrium sulfuricum 1 g; Wasser 100 ccm.

Anwendung wie Kaliumbichromat allein; doch fällt naturgemäß die allmähliche Steigerung der Konzentration weg. Wirkt zugleich als sehr schonendes Entkalkungsmittel.

Kaliumbichromat-Essigsäure nach Tellyesniczky.

Kaliumbichromat 3 g; Essigsäure 5 ccm; Wasser 100 ccm. Man braucht sich nicht genau an diese Vorschrift zu halten. Kleine Objekte werden in 1—2 Tagen fixiert. Das Auswaschen geschieht in Wasser. Die Alkoholbehandlung beginnt mit 15%igem Alkohol. Fixiert Plasma und Kern gut.

Kaliumbichromat-Kupfersulfat. Erlickis Gemisch.

Kaliumbichromat 2,5 g; Kupfersulfat 0,5 g; Wasser 100 ccm. Das Fixieren erfordert mehrere Tage. Auswaschen 1—2 Stunden. Sehr gutes Härtemittel für größere Objekte.

Zweifaches Chromsalzverfahren.

Man fixiert entweder mit einem der genannten Chromsalz- oder Chromsäuregemische und härtet mit reinem Bichromat oder Müllerscher Flüssigkeit nach, oder aber die Vorbehandlung geschieht mit einem beliebigen anderen Fixierer.

Sublimat, $HgCl_2$.

Löst sich in etwa 15 Teilen Wasser. Lösungen in destilliertem Wasser sind unbegrenzt haltbar. Wird meist in gesättigter Lösung kalt, oder wenn momentanes Abtöten des ganzen Tieres erforderlich, auch heiß angewandt. Für zarte Objekte empfiehlt es sich, eine verdünnte Lösung zu nehmen. Beim Fixieren von Seetieren tritt an Stelle des dest. Wassers Seewasser.

Wirkt sehr schnell, bei kleinen Objekten innerhalb weniger Minuten. Doch verhindert die starke Fällung eine ausgiebige Tiefenwirkung. Die Objekte sollen daher nicht größer als 0,5 ccm sein. Man lasse die Objekte nicht länger in dem Fixierer, als bis sie durchfixiert sind. Auswaschen in 70%igem Alkohol mit Zusatz von Jod-Jodkali, erst mehr, später nur wenig, solange bis keine Entfärbung der Flüssigkeit mehr zu bemerken ist. Man setze jedoch auch im Anfang nur soviel zu, daß der Alkohol eine kognakbraune Farbe annimmt. Die sog. Lugolsche Lösung, bestehend aus 1 Teil Jod, 2 Teilen Jodkali und 100 Teilen Wasser, ist mit etwa

3 bis 4 Teilen 70%igem Alkohol zu verdünnen. Jodtinktur ist weniger wirksam als Jod-Jodkali, da die bei Anwendung des letzteren stattfindenden Umsetzungen die beste Löslichkeit ergeben. Doch wird bei diesem Auswaschen nicht allein das überschüssige Sublimat ausgezogen, sondern teilweise auch die Eiweißverbindungen desselben. Die Färbbarkeit der Objekte ist, wenn das Jod wieder gut entfernt wurde, eine sehr gute.

Alle Sublimatgemische greifen Metalle an. Man verwende daher Pinzetten und Spateln aus Holz, Hartgummi, Glas usw., ferner als Nadeln Igel- oder Kaktusstacheln usw.

Sublimat-Kochsalzlösung.

Sublimat im Überschuß! in physiologischer (0,5–0,75%iger) Kochsalzlösung oder in Meerwasser. Es löst sich viel mehr Sublimat als in reinem Wasser. Nachbehandlung wie bei reinem Sublimat. Sublimatkochsalzlösungen werden oft für Seetiere oder Wirbeltiergewebe empfohlen, sind aber nicht einwandfrei, da ein Teil des gefällten Eiweißes gelöst wird.

Sublimat-Kaliumbichromat.

Alkoholische Sublimatlösung 1 Teil; 2%ige wässerige Kaliumbichromatlösung 1 Teil. Nur für kleine Objekte verwendbar.

Sublimat-Kaliumbichromat-Essigsäure: Zenkers Gemisch.

Besteht aus 5% Sublimat und 5% (oder nur 3%) Eisessig in Müllerscher Flüssigkeit (s. diese). Zusatz von Formol (bis zu 10%) kurz vor Gebrauch gibt klare Bilder mit scharfen Zellkonturen. Fixationsdauer mehrere Stunden. Auswaschen in Wasser, dann Jodalkohol (s. Sublimat). Fixiert Kern und Plasma sehr gut. Doch entstehen bei zu langem Verweilen in der Flüssigkeit schwer zu beseitigende Niederschläge. Um sie zu vermeiden, fixiert man nur kurze Zeit und härtet in reiner Müllerscher Flüssigkeit nach. Die Färbbarkeit wird durch Zenkers Gemisch nicht beeinträchtigt.

Sublimat-Essigsäure.

Die Zusammensetzung ist von den verschiedenen Autoren sehr variiert worden. Meist verwendet man konzentrierte (6—7 %) Sublimat-Lösung in destilliertem Wasser mit 5 % Essigsäure-Zusatz; oder Alkohol abs. 200 ccm, Sublimat 1—10 g, Eisessig 2—4 ccm. Die Essigsäure bewirkt ein schnelles Eindringen und verhindert, daß die Sublimateiweißverbindungen in Jodkali in Lösung gehen.

Sublimat-Platinchlorid.

1 Teil 1 %ige wässrige Platinchloridlösung (s. Platinchlorid-Chromsäure); 1 Teil konzentrierte wässrige Sublimatlösung; 2 Teile dest. Wasser. Wird für jüngere Embryonen empfohlen.

Sublimat-Pikrinsäure-Essigsäure.

Konzentrierte wässrige Sublimatlösung 1 Teil; konzentrierte wässrige Pikrinsäure 1 Teil; dest. Wasser 2 Teile; Essigsäure 1—2 %. Auswaschen in Jod-Alkohol. Für Stützsubstanz der Wirbeltiere empfohlen. vom Rath nimmt gleiche Teile konc. wäss. Pikrins. und konc. Sublimatlös. in Wasser oder heißer Kochsalzlös., dazu ($^1/_2$—) 1 % Eisessig. Gab uns vortreffliche Fixationen bei Mollusken. Man kann (z. B. für Wirbeltiere) auf 100 Teile des Gemisches 10 Teile 2 %iger Osmiums. zufügen.

Sublimat-Eisessig-Salpetersäure.

a) nach Gilson.

46 %ige Salpetersäure 15 ccm; Eisessig 4 ccm; Sublimat 20 g; 60 %iger Alkohol 100 ccm; Wasser 880 ccm.

b) nach Petrunkewitsch.

Wasser 300 ccm; Alkohol abs. 200 ccm; Eisessig 90 ccm; Salpetersäure 10 ccm; Sublimat bis zur Sättigung.

Beide Gemische werden sehr empfohlen und viel angewandt. Für zarte Objekte ist oft eine Verdünnung ratsam. Auch nehme man in solchen Fällen das Gemisch nicht heiß, sondern höchstens angewärmt. Auswaschen in 70 %igem Alkohol mit Jod-Jodkali-Zusatz (s. Sublimat).

Eisenchlorid.

Man verwendet eine 2,5 bis 5%ige Lösung von Eisenchlorid in 70%igem Alkohol, oder eine 2%ige Lösung in nur 6%igem Alkohol. Niederschläge werden durch Zusatz von einigen Tropfen HCl beseitigt. Dringt langsam ein; jedoch besonders für kleine pelagische Organismen sehr empfohlen. Beeinflußt viele Färbungen sehr günstig. Auswaschen in 50%igem Alkohol mit ½—1% Oxalsäure-Zusatz.

Essigsäure.

Als Fixierer wegen Quellungswirkung kaum allein zu gebrauchen (bis 2% Lösung oder auch konzentriert). Ihre Hauptbedeutung liegt im Ansäuern anderer Gemische. Verwendung bei Beobachtung frischer Objekte siehe S. 19.

Eisessig-Kupferacetat-Kupferchlorid- etc. Gemisch von Ripart u. Petit. Kupferacetat 0,3 g; Kupferchlorid 0,3 g; Eisessig 1 ccm; schwaches Kampferwasser 75 ccm; dest. Wasser 75 ccm; ev. Zusatz von Sublimat oder Osmiumsäure in Spuren. Für zarte Objekte (niedere Pflanzen) in Frankreich viel verwendet. Die Verbindung mit Methylgrün (siehe dieses) gestattet gleichzeitiges Färben des Objekts.

Pikrinsäure. In gesättigter Lösung kalt oder heiß anzuwenden, da schwache Lösung maceriert. Man fixiert 1 Minute bis einen Tag. Auswaschen in Alkohol, da die Objekte in Wasser wieder weich werden (s. S. 34). Auch geschieht das Färben aus diesem Grunde am besten in alkoholischer Lösung. Die Entfernung der Säure kann durch Erwärmen des Alkohols beschleunigt werden.

Pikrinschwefelsäure. In verschiedenen Mischungen angewandt. Am gebräuchlichsten:

Gemisch von Kleinenberg, wässrige gesättigte Pikrinsäurelösung 100 ccm; Schwefelsäure 2 ccm; filtriert und mit 300 ccm Wasser verdünnt. Kreosotzusatz so viel, wie sich löst.

Gemisch von Mayer, konzentr. Schwefelsäure 2 ccm; Wasser 100 ccm; Pikrinsäure bis zur Sättigung.

Man fixiert mehrere Stunden, wäscht am besten in warmem 70 %igem Alkohol einige Stunden aus, dann in 90%igem solange, bis die Gelbfärbung hell wird oder ganz verschwindet. Verursacht bei manchen Geweben Quellungen. Für Objekte, die Kalk enthalten, ist sie unbrauchbar, da sie diesen als Gips niederschlägt. Ihre Vorteile liegen darin, daß sie schnell tötet, gut eindringt, sich leicht entfernen läßt und jede Färbung des Objekts gestattet.

Pikrinsalpetersäure nach Mayer. Wasser 100 ccm; Salpetersäure (von 25%iger N_2O_5) 5 ccm; Pikrinsäure bis zur Sättigung. Auswaschen in 70%igem Alkohol, oder Alkohol 90% + 2% Salpetersäure. Der Pikrinschwefelsäure überlegen. Gestattet auch das Fixieren kalkhaltiger Objekte, da kein Gips entsteht. Für Turbellarien besonders zu empfehlen, da sich die Tiere darin beim Absterben ausstrecken.

Ähnlich wirkt:

Pikrinsalzsäure. Wasser 100 ccm; Salzsäure (von 25% HCl) 8 ccm; Pikrinsäure bis zur Sättigung.

Pikrinessigsäure nach Boveri: konzentr. wässrige Lösung von Pikrinsäure 100 ccm; Wasser 200 ccm; Essigsäure 3 ccm. Auswaschen in 70%igem Alkohol.

Nach Davidoff: konzentr. wässrige Lösung von Pikrinsäure 3 Volumina; Essigsäure 1 Volumen. Auswaschen in 70%igem Alkohol.

Pikrinosmiumessigsäure nach vom Rath. Konzentr. wässrige Lösung von Pikrinsäure 100 ccm; 2%ige Osmiumsäurelösung 6 ccm; Essigsäure 1 ccm. Man kann auch noch $^1/_2$ gr Platinchlorid in 5 ccm Wasser zusetzen und dann 12 ccm, 6 ccm oder gar keine Osmiumsäure nehmen. Je nach der Größe der Objekte wird Minuten bis Tage lang fixiert. Dann Überbringen in 75%igen Alkohol.

Alkohol gibt nur konzentriert oder sehr schwach (30%) brauchbare Resultate.

Absoluter Alkohol wird kalt oder heiß angewandt. Dringt sehr schnell ein. Nur solange er nahezu absolut ist,

tritt die Koagulation ein, bevor Schrumpfungsprozesse einsetzen können. Es ist demnach darauf zu achten, daß die dem Objekt entzogene Flüssigkeitsmenge den Alkohol nicht zu sehr verdünnt. Man verwende daher möglichst große Mengen Alkohol und lege ferner das Objekt nicht auf den Boden des Gefäßes, sondern halte es in der obersten Flüssigkeitsschicht, da das spez. schwerere Wasser nach unten sinkt. Fixationsdauer Minuten bis Stunden. Für Arthropoden und Schwämme viel gebraucht.

30%iger Alkohol. Wegen der Macerierungsgefahr ist bald in allmählich steigenden und nachhärtenden Alkohol überzuführen.

Tabelle zum Verdünnen des Alkohols mit Wasser.

Die eingeklammerten Zahlen geben das spezifische Gewicht an.

Der verdünnte Alkohol soll zeigen	Der zu verdünnende Alkohol zeigt								
	90% (0,833)	85% (0,849)	80% (0,863)	75% (0,876)	70% (0,889)	65% (0,901)	60% (0,913)	55% (0,923)	50% (0,933)
85% (0,849)	6,56	—	—	—	—	—	—	—	—
80% (0,863)	13,79	6,83	—	—	—	—	—	—	—
75% (0,876)	21,89	14,48	7,20	—	—	—	—	—	—
70% (0,889)	31,05	23,14	15,35	7,64	—	—	—	—	—
65% (0,901)	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15	—	—	—	—
60% (0,913)	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76	—	—	—
55% (0,923)	67,87	57,90	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	—	—
50% (0,933)	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	10,35	—
45% (0,943)	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	22,90	11,41
40% (0,951)	130,80	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55
35% (0,958)	163,28	148,01	132,88	117,82	102.84	87,93	73,08	58,31	43,59
30% (0,965)	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101.71	84.54	67.45
25% (0,970)	266,12	245,15	224,30	203,53	182,83	162,21	141,65	121,16	100,73
20% (0,975)	355,80	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	175,96	150,55
15% (0,980)	505,27	471,00	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	267,29	233,64
10% (0,986)	804,54	753,65	702,89	652,21	601,60	551,06	500,59	450,19	399,85

Die Zahlen dieser Rubriken geben an, wieviel Raumteile Wasser zu 100 ccm des zu verdünnenden Alkohols zuzusetzen sind.

Alkohol-Eisessig nach Carnoy. Absoluter Alkohol 3 Teile; Eisessig 1 Teil. Man fixiert Minuten bis 1 Stunde. Auswaschen in abs. Alkohol, der nach 24 Stunden zu wechseln ist. Besonders für schwer durchdringbare Objekte (Ascariseier) sehr geeignet.

Modifikation von van Beneden u. Neyt. Abs. Alkohol 1 Teil, Eisessig 1 Teil.

Modifikation von Carnoy. Abs. Alkohol 6 Teile, Chloroform 3 Teile, Eisessig 1 Teil. Dringt schneller ein als die ursprüngliche Mischung. Fixationsdauer selbst für größere Objekte nur 1 Stunde. Nachbehandlung wie oben. Sehr oft angewandt.

Modifikation von Carnoy u. Lebrun. Zu dem chloroformhaltigen Gemisch (s. vorhergehendes) wird Sublimat bis zur Sättigung zugesetzt. Man fixiert bis das Objekt zu Boden sinkt und bringt es dann erst in schwachen und später in 80 %igen Alkohol.

vom Rath empfiehlt 1 % Eisessig und ½ % Sublimat in Alkohol abs.

Formaldehyd. CH_2O, ein Gas, das in 40 %iger wässeriger Lösung als Formol, Formalin und Formalose im Handel ist. Reagiert durch den Gehalt an Ameisensäure meist sauer (entkalkt daher langsam) und enthält gewöhnlich Methylalkohol; zersetzt sich andernfalls leicht unter Bildung von Paraformaldehyd (weißer Niederschlag). Durch Zusatz von Glyzerin kann dies vermieden werden. Die Fixationswirkung beruht auf einer chemischen Veränderung (Methylenierung) der Eiweißkörper. Bei dauerndem Gebrauch wegen der Dämpfe sehr gesundheitsschädlich.

Die besten Resultate ergibt eine 4 %ige wässrige Formaldehydlösung = auf das Zehnfache seines Volumens verdünntes Formol. Sollen die Objekte zu histologischen Zwecken Verwendung finden, so lasse man sie höchstens einige Wochen im Fixierer und bringe sie dann in hochprozentigen Alkohol. Andernfalls können sie dauernd in Formol aufbewahrt werden.

4 %ige Formaldehydlösung fixiert Plasma und Kern recht annehmbar, härtet zugleich die meisten Gewebe vorzüglich und gestattet jede Art der Nachbehandlung.

Formaldehyd-Gemische halten sich meist nur kurz, da das Formaldehyd reduzierend wirkt.

10 %iges Formol und Alkohol in gleichen Mengen fixiert Echinodermen vortrefflich. Wegen Entkalkungsgefahr bald in Alkohol (70 %) überführen.

Formaldehyd-Alkohol-Eisessig in verschiedenen Modifikationen: 95 %iger Alkohol 20 Teile; Formol 6 Teile; Eisessig 1 Teil; Wasser 40 Teile. Oder: 95 %iger Alkohol 15 Teile; Formol 5 Teile; Eisessig 1 Teil; Wasser 30 Teile.

Formaldehyd-Pikrinsäure. Eine große Anzahl Variationen sind in Gebrauch, von denen hier nur eine angeführt sein möge: wässrige, konzentr. Pikrinsäure 90 ccm; konzentr. Formol 10 ccm. Man fixiert bis zu zwei Stunden und härtet dann in aufsteigendem Alkohol nach.

Formol-Pikrin-Essigsäure. Formol 8 ccm; 1 %ige Pikrinsäure in 85 %igem Alkohol 20 ccm; Eisessig 2 ccm. Es ist ratsam, sich die Mischung erst vor Gebrauch herzustellen. Für Arthropoden und besonders für Spinnen sehr empfehlenswert.

Die Objekte bleiben einen halben bis einen Tag in der Flüssigkeit. Es folgt Auswaschen in etwa 80 %igem Alkohol.

Formaldehyd - Kupfersulfat - Sublimat - Eisessig. 7 %iges Formol 200 ccm; Eisessig 1 ccm; Kupfersulfat 4 g; Sublimat bis zur Sättigung. Fixationsdauer mehrere Stunden.

Schnellhärten mit Formaldehyd. Das Objekt wird am besten erst auf dem Gefriermikrotom geschnitten und dann die Schnitte in Formaldehyd fixiert und gehärtet. Man verfährt hierbei wie folgt: Anfertigung der Gefrierschnitte; Übertragen derselben in 4 %ige Formaldehydlösung bis zu ¼ Minute, hierauf in Formaldehydalaunkarmin 2—3 Minuten; Auswaschen in Wasser ½ Minute; Alkohol 80 % ½ Minute; absoluter Alkohol 10 Sekunden; Überführen in Karbolxylol

$^1/_2$ Minute; Kanadabalsam. Man kann mit dieser Methode in weniger als 10 Minuten von frischen Objekten gefärbte Dauerpräparate gewinnen.

Heißes Wasser. Wurde bei Borstenwürmern mit Erfolg angewendet.

Einbetten und Schneiden.

Im lebenden Zustande sind viele Gewebe von Tieren und Pflanzen etwas durchsichtig; man kann also einzellige Lebewesen, andere kleine Organismen, dünne Häutchen und dergleichen ohne weiteres bei durchfallendem Licht unter dem Mikroskop beobachten.

In den allermeisten Fällen können wir aber die Beobachtung nicht damit beginnen, daß wir die Objekte auf dem Objektträger unter das Mikroskop bringen. Sie sind dazu zu dick und undurchsichtig. Bei der Vergrößerung wird die beleuchtende Lichtmenge einer kleinen Stelle auf die viel größere Fläche des Bildes dieser Stelle verteilt, so daß sich schon geringe Grade von Undurchsichtigkeit stark bemerkbar machen. Größere Objekte erscheinen daher einfach dunkel ohne Einzelheiten, höchstens läßt sich die Oberfläche eines Gegenstandes direkt untersuchen; das auffallende Licht kann hier für schwache Vergrößerungen genügen, für stärkere müssen auch dann noch besondere Hilfsmittel (Vertikalilluminator) in Anwendung gebracht werden.

Auch kleinere Objekte (bis etwa 1 mm Durchmesser oder Dicke), die im lebenden Zustande noch direkte Beobachtung zulassen, werden nach der Fixierung und Konservierung so undurchsichtig, daß sie besonderer weiterer Zurichtung bedürfen.

Man kann sich nun in vielen Fällen dadurch helfen, daß man die Objekte zur Beobachtung in „Aufhellungsmittel“ bringt, die die Gewebe durchsichtig machen, indem sie größere Unterschiede im Brechungsvermögen ausgleichen. Als solche kommen unter anderem manche Öle in Betracht (z. B.

Cedernholz- oder Nelkenöl); besonders viel gebraucht werden solche Stoffe, die aufhellend wirken und gleichzeitig als definitive Einschlußmittel brauchbar sind: nämlich Glyzerin oder Glyzeringelatine, Laevulosemischungen in Wasser (s. S. 103), Venet. Terpentin in 96%igem Alkohol und Kanadabalsam (oder Dammarlack) in Xylol. In erstere können die Objekte direkt aus Wasser gebracht werden, in Terpentin geht man aus etwa 90%igem Alkohol; vor der Überführung in die letztgenannten Harze muß durch absoluten Alkohol das Wasser völlig entfernt und (zwischen Alkohol und Harz) Xylol als Zwischenmedium gebraucht werden. Von dem Einschlußmittel wird ein Tropfen auf einen Objektträger gebracht, das Objekt hineingelegt und dann ein Deckglas (eventuell mit kleinen Wachsstützen an den Ecken) aufgelegt.

Diese Methode reicht für manche Zwecke aus, sie ist jedoch nur bei kleinen Objekten anwendbar, gibt bei diesen aber, zumal nach vorheriger Bräunung in Osmiumsäure oder Färbung in Karmalaun, Alaunkarmin, Magnesiakarmin, Boraxkarmin, Parakarmin oder Haematoxylin gute Übersichtsbilder.

Die Einschließung in aufhellenden Medien kommt als Hilfsmethode bei der Herstellung von fast allen mikroskopischen Präparaten zur Anwendung. Sie genügt aber für die feinere Analyse größerer Objekte allein nicht; diese bleiben immer noch zu undurchsichtig und dazu kommt, daß unregelmäßige Brechung in den höheren Schichten eine genaue mikroskopische Beobachtung der unteren Schichten hindert usw.

Aus diesem Grunde muß man zur Zerlegung des Objektes in dünne Platten übergehen: der Petrograph muß Dünnschliffe seiner Mineralien, der Biologe Dünnschnitte seiner Gewebe herstellen.

Solche Schnitte kann man aus freier Hand mit dem Rasiermesser anfertigen. Man nimmt das Objekt an einem

Ende zwischen Daumen und Zeigefinger, schneidet dann ein Stück am freien Ende ab, um eine gute Schnittfläche zu erzeugen und kann nun versuchen, ein dünnes Blättchen abzuschneiden, i n dem man das Messer auf sich zu durch das Objekt „zieht“ (nicht einfach durchdrückt).

Dabei ergeben sich zwei Schwierigkeiten.

Zunächst eignen sich nur wenige Gewebe (gehärtete Leber, Knorpel, viele pflanzliche Objekte) dazu, so geschnitten zu werden. Die meisten Gewebe sind so weich, daß sie dem Messer ausweichen, durch den Druck von Hand oder Messer deformiert werden und nie eine glatte Schnittfläche ergeben. Diesem Mangel kann man durch Einbetten der Objekte in zum Schneiden besonders geeignete Substanzen oder durch Gefrierenlassen abhelfen.

Die zweite Unvollkommenheit liegt in der Unmöglichkeit aus freier Hand Schnitte von gleichmäßiger Dicke herzustellen. Dazu kommt, daß es für viele Zwecke nicht genügt, wenn nach mehreren Versuchen einmal ein guter Schnitt gelingt, sondern daß es erwünscht ist, ein Objekt vollständig in Schnitte von bestimmter Dicke zu zerlegen, aus denen sich dann die ganze Anatomie oder Struktur rekonstruieren läßt. Diesen Forderungen dienen besondere Schneidemaschinen, die Mikrotome; bei ihnen wird das Objekt mit Hilfe einer Mikrometerschraube um genau bestimmte, kleine Beträge gehoben (bezw. vorgeschoben), während ein Messer in bestimmter Höhe dagegen bewegt werden kann.

Einbettungs- und Schneidetechnik haben sich in engstem Anschluß aneinander entwickelt; die Art des Schneidens muß sich nach der Einbettungsweise richten. Der Schilderung der Schneidetechnik muß daher eine kurze Besprechung der Einbettungsmethoden vorangeschickt werden. Eine Unzahl von Anweisungen liegt darüber in der Literatur vor. Wir beschränken uns auf die bewährten, allgemein anwendbaren Hauptmethoden.

I. Die Vorbereitung der Objekte zum Schneiden. Einbettungsmethoden.

Eine primitive aber gelegentlich immer noch brauchbare Einbettungsmethode besteht darin, die Objekte zwischen zwei Stückchen Holundermark oder (in Alkohol oder sonstwie gehärteter) Leber einzuklemmen. Um eine zu starke Pressung zu vermeiden, kann man in die Leber- oder Markstücke Kerben einschneiden, die sich im groben der Form des zu schneidenden Objektes etwas anpassen. Gehärtete Leber und das von den Botanikern viel gebrauchte Holundermark lassen sich gut schneiden, und so schneidet sich das eingeklemmte an sich ungeeignetere Stückchen mit. Die beiden Gewebe kommen meist beim Schneiden aus freier Hand in Anwendung; es lassen sich auf diesem Wege brauchbare Schnitte durch Vegetationskegel, Wurzelspitzen, Blätter, junge Sprosse, auch wohl durch gehärtetes Gehirn und dergleichen machen. Man kann die Objekte auch samt dem Holundermark in die Klemme des Mikrotoms einschrauben; Handmikrotome, z. B. das sogenannte Zylindermikrotom dürften dafür besonders in Betracht kommen. Nachdem das Objekt mit seiner Hülle in geeigneter Lage und Höhe in der Klemme festgeschraubt worden ist, hebt man dasselbe um den gewünschten Betrag durch Drehen der Mikrometerschraube (unten) und kann auf diese Weise eine Reihe gleich dicker Schnitte erzielen. Das Messer wird dabei — auf der Glasbahn oder dem Glastisch der Handmikrotome gleitend — durch das Objekt gezogen. So angefertigte Schnitte sind meist zur direkten Beobachtung bestimmt. Besonders

gelungene können fixiert (in 70%igem Alkohol, Formol [10% der 40%igen Stammlösung von Formaldehyd in Wasser] oder 1%iger Osmiumsäure) und dann durch Wasser in Glyzeringelatine oder Gummilaevulose, durch 90%igen Alkohol in Terpentin, oder durch Alkohol abs. und weiter durch Xylol in Kanadabalsam auf den Objektträger als Dauerpräparat gebracht werden.

Sehr dünne Schnitte lassen sich auf dem angeführten Wege nicht erzielen: das Objekt kann trotz der Einklemmung etwas zusammengedrückt werden und ausweichen. Auch ist die Gesamtschnittfläche nicht homogen genug.

Um dünnere Schnitte mit größerer Sicherheit herstellen zu können, mußte man daher nach Substanzen suchen, die sich nicht nur als Mantel um die Objekte legen, sondern in alle kleinsten Lücken hineinbringen lassen. Solche Medien müssen in flüssiger Form in die Objekte gebracht und nachher wieder in den festen Aggregatzustand übergeführt werden. Dazu eignen sich Seifen, Gelatine, Paraffin und Zelloidin sowie Wasser bezw. Eis. Seife und Gelatine kommen nur für besondere Fälle in Betracht und werden nur von wenigen gebraucht. Die Paraffin-, die Zelloidin- und die Gefriermethode sind jedoch allgemein gebräuchlich und bis ins einzelne durchgearbeitet; jede dieser Methoden ist unentbehrlich und hat ihr besonderes Anwendungsfeld.

Am meisten gebraucht wird die Paraffinmethode; sie wird angewendet bei kleineren Objekten (Querschnitt kleiner als 1—2 qcm) und fast ausschließlich wenn es auf dünne Schnitte (0,02 bis 0,0025 mm = 20—2,5 μ) ankommt.

Die Zelloidinmethode ist indiziert, wenn es sich um größere Objekte handelt oder um Material, das die Erwärmung auf den Schmelzpunkt des Paraffins nicht gut verträgt. Sie bietet die besten Garantien für Erhaltung ganz normaler Lagerungsverhältnisse der Teile eines Schnittes.

Die Zelloidinmethode ist umständlicher und gestattet nicht so geringe Schnittdicken wie die Paraffineinbettung. Die meisten Vorteile der Paraffin- und Zelloidinmethode können in einem kombinierten Verfahren vereinigt werden.

Die Gefriermethode kommt immer dann zur Anwendung, wenn Schnitte in kürzester Zeit (z. B. während einer Operation) fertiggestellt werden müssen. Sie wird am meisten von Pathologen gebraucht.

1. Das Einbetten in Paraffin.

Um die günstigsten Bedingungen für tadellose Schneidbarkeit zu bekommen, muß man, wie bemerkt, danach streben, das Objekt mit dem Einbettungsmittel nicht nur zu umgeben, sondern es damit völlig zu durchtränken. Die bloße Verflüssigung des Einbettungsmittels, also in unserem Falle des Paraffins, genügt dazu nicht; wir müssen vielmehr dafür sorgen, daß die in dem Objekt enthaltenen Flüssigkeiten Paraffin lösen und dasselbe nicht zum Ausfall bringen. Vor dem Durchtränken mit Paraffin wird das Objekt also zweckmäßigerweise in ein Lösungsmittel des Paraffins gebracht, das nun dem Einbettungsmittel bei seinem Eindringen als Vehikel dienen und selbst durch längeres Verweilen aus dem Objekt in das überschüssige Paraffin diffundieren und durch Verdampfen völlig entfernt werden kann. Nun mischen sich aber diese paraffinlösenden Intermedien meist nicht mit Wasser (oder sie lösen nur sehr wenig davon), so daß wir vor der Überführung in das Intermedium das Wasser durch absoluten Alkohol gründlich entfernen müssen. Meist ist dem schon durch den 70%igen Alkohol, in dem wir die Objekte gewöhnlich aufheben, etwas vorgearbeitet. War das Objekt in einem anderen Konservierungsmittel, z. B. in 10%igem Formol (= 10% von der käuflichen 40%igen Formaldehydlösung), das nicht selten als Fixierungsmittel und Aufbewahrungsmittel in einem dient, so müssen wir erst

in 70%igen Alkohol übergehen. Darnach ergibt sich folgendes Schema für die Vorbereitungen zur Einbettung:

Lebendes Objekt

↓

Fixierung (Sublimat, Säuren etc.), zuweilen auch 70%iger Alkohol od. 10%iges Formol

↓

Auswaschen des Fixierungsmittels (in Wasser od. 70%igem Alkohol)

↓

Konservierung (belieb. lang. Aufbewahr.) in 70%igem Alkohol od. 10%igem Formol

---

Vorbereitg. z. Einbetten: Überführen in **96**%ig. **Alkohol** ← 70%ig. Alkohol

„ ↓ „ **absoluten Alkohol**
(Chloroform-Alkohol)

„ ↓ „ **Zwischenmedium** (Chlorof. od. Cedernholzöl)
(Chloroform-Paraffin)

„ ↓ „ **geschmolzenes Paraffin**

Einbetten.

Man bewahrt die Objekte in 70%igem Alkohol auf, weil stärkere Konzentrationen die Objekte brüchig machen, schwächere aber auf die Dauer Zerfall (Maceration bei „Drittel-Alkohol" [33%]) nach sich ziehen können. Meist kann man das Objekt aus dem 70%igen Alkohol ohne weiteres in den 96%igen bringen, bei ganz zarten, leicht schrumpfenden Objekten kann man die Konzentration allmählich steigern (ganz langsam z. B. durch einen Docht aus einem Gefäß mit 96%igem zu dem mit 70%igem). Weit gefährlicher ist der Übergang in das Intermedium. Vortreffliche Paraffinlöser, die gleichzeitig sich mit Alkohol abs. mischen und schnell eindringen, sind Xylol und Benzol; sie werden auch vielfach gebraucht. Man schaltet aber bei vielen Objekten mit Vorteil vorher eine Mischung von gleichen Teilen Alkohol abs. und Benzol (bezw. Xylol) ein, um die starken Diffusionsströmungen und damit die Gefahr des Schrumpfens etwas abzuschwächen. Zarter als bei Anwendung von Xylol oder Benzol, vollzieht sich der Übergang bei Anwendung von

Chloroform als Intermedium, das den Alkohol langsam entfernt, besonders für kleine Objekte aber sehr empfohlen werden kann. Auch diesem Mittel kann man mit Vorteil eine Mischung gleicher Teile Alkohol abs. und Chloroform vorhergehen lassen. Noch allmählicher vollzieht sich der Ersatz des Alkohols, wenn man denselben in einem kurzen etwa 5 cm hohen (oben verschließbaren!) Zylinderglas oder in einer Glasdose über das schwerere Chloroform schichtet. Man gießt erst Chloroform bis etwas unter die Hälfte ein und füllt dann langsam (eventuell Schräghalten oder an einem Glasstab) absoluten Alkohol nach. Es bildet sich dabei nur eine dünne Mischungsschicht der beiden verschieden schweren Medien. In diese Mischungsschicht sinkt das Objekt, wenn wir es nach genügender Entwässerung in absol. Alkohol in jenes Gefäß mit Alkohol und Chloroform bringen. Von unten nimmt dann das Objekt mehr und mehr von dem spezifisch schweren Chloroform auf und sinkt damit gleichzeitig mehr und mehr zu Boden („Senkmethode".) Durch Schütteln kann man die Mischungsschicht breiter machen und den Prozeß, der sehr lange dauern kann, beschleunigen. Zum Schluß ist empfehlenswert, das Objekt zur *völligen* Beseitigung des Alkohols einmal in ganz reines (wasserfreies!) Chloroform zu legen. Neben Chloroform ist auch Cedernholzöl als ausgezeichnetes Intermedium zu nennen; es ersetzt den Alkohol schneller als Chloroform, scheint aber andrerseits weniger schrumpfend zu wirken als Xylol. Doch kann man auch dabei durch Einschaltung einer Mischung schonender vorgehen.

Aus dem reinen (alkoholfreien!) Intermedium übertragen wir dann das Objekt gleich in geschmolzenes Paraffin. Bei Anwendung von Cedernöl als Überführungsmittel pflegt man direkt in Paraffin zu gehen. Das Öl verdunstet langsam und tritt in das umgebende Paraffin über, so daß diesem Zeit bleibt einzudringen. Allerdings löst Chloroform mehr als doppelt so viel Paraffin als Cedernholzöl, und dasselbe gilt von Benzol und Xylol. Bei diesen letztgenannten Stoffen pflegt man

zuweilen auch den Übergang in Paraffin allmählicher zu gestalten: man kann schon zu dem kalten Intermedium Paraffinschnitzel allmählich zusetzen, dann auf etwa 30° erhitzen und noch mehr zugeben, endlich bei etwa 55° das Chloroform allmählich verdunsten und so zu dem reinen, nunmehr flüssigen Paraffin übergehen. Chloroform sinkt im Paraffin zu Boden; man hängt die Objekte also am besten dicht unter der Oberfläche auf. Es ist empfehlenswert vor dem eigentlichen definitiven Einschmelzen aus dem Chloroformparaffin für längere Zeit in reines Paraffin überzugehen; Reste von Chloroform schädigen die Schneidbarkeit. Das gilt nicht vom Cedernholzöl. Doch soll man immer etwa die Hälfte der Zeit, die die Objekte in der höheren Temperatur zubringen, auf das Verweilen im reinen Paraffin rechnen.

Zur Technik der Überführungen mag noch gesagt sein, daß man sich für das Paraffin am besten kleiner Porzellantiegel (von etwa 5 cm Durchmesser) bedient. Für den 96 %igen Alkohol kann man ein etwas größeres, für das Intermedium ev. ein kleineres Gefäß wählen. Man überträgt das Objekt nicht mit der Pinzette, sondern mit einem Horn- oder Metallspatel. Letzterer ist für die Arbeit im geschmolzenen Paraffin zu empfehlen; denn er läßt sich auf etwa 60° erhitzen, so daß ein lästiges Erstarren des Paraffins an dem Spatel vermieden werden kann. Alle Überführungen aus einer Flüssigkeit in die andere vollzieht man natürlich möglichst schnell; so wird ein Wasserdampfzutritt nach dem Alkohol abs. und ein Lufteindringen durch schnelle Verdunstung des flüchtigen Chloroforms vermieden. Natürlich darf man weder auf den Alkohol abs. noch auf die Intermedien hauchen, in letzteren entsteht dabei eine Trübung durch die Wasserteilchen. Über die Zeit, die ein Objekt in den verschiedenen Medien zuzubringen hat, läßt sich nichts Allgemeingültiges sagen; es ist das je nach der Größe, Durchlässigkeit usw. der Objekte sowie bei den einzelnen Intermedien verschieden. Vor allem ist auf völlige Beseitigung des Wassers zu achten.

Für ein gut durchlässiges Objekt von etwa 5 mm Durchmesser mag man ungefähr 4 Stunden für 96 %igen Alkohol, 2 Stunden für absoluten und nochmals 2 Stunden für erneuerten absoluten Alkohol nehmen. Dann etwa 1 Stunde für Alkohol-Cedernholzöl, 2 Stunden für reines Cedernöl, endlich kann man das Objekt etwa 2 Stunden im ersten und nochmals 2 Stunden im reinen Paraffin lassen. Für die Überführung in Chloroform wird man etwas mehr Zeit nehmen (das Senkverfahren kann Tage in Anspruch nehmen), doch soll man auch hier nicht zu weit gehen, weil die Objekte sonst zu spröde werden. Zu langes Verweilen bei der hohen Temperatur im flüssigen Paraffin kann (bei Gegenwart von H_2O oder Alkoholspuren) gleichfalls schaden; daher z. B. das Bestreben bei Anwendung von Chloroform schon bei niedrigerer Temperatur möglichst viel Paraffin hineinzubringen. Auch kann man erst Paraffin von niedrigem Schmelzpunkt nehmen.

Da das Objekt längere Zeit in geschmolzenem Paraffin liegen muß, und dieses weder erstarren noch auch überhitzt werden darf, so bedient man sich am besten eines Thermostaten, obwohl man bei fortwährendem Zusehen auch mit einem Wasserbad oder noch einfacheren Mitteln auskommt. In dem Thermostat soll immer ein Emailgefäß (von ungefähr ¼ Liter Inhalt) mit Handgriff und Ausguß stehen, in dem sich flüssiges reines Paraffin befindet. Daneben zwei Porzellantiegel von 4—5 cm Durchmesser, einer für das (Chloroform-) I. Paraffin, ein zweiter für das II. Paraffin, in das wir das Objekt nach Verdunsten der Hauptmenge des Intermediums übertragen.

Im allgemeinen nimmt man Paraffin vom Schmelzpunkt 50°. Die Temperatur des Thermostaten wird dann etwas höher, also etwa auf 52—55° gestellt. Im Sommer muß man etwas schwerer schmelzbares Paraffin nehmen (55°-58°-60°). Für große und dicke Schnitte (0,04—0,02 mm) nimmt man weicheres (40°—48°), für kleine dünne Schnitte (0,005—0,0025 mm) hartes Paraffin (50°—60°). Aus einem

harten und einem weichen Paraffin kann man sich eine gewünschte Mittelsorte zusammenschmelzen.

Am besten eignet sich zum Schneiden ein Paraffin, das gemischt ist aus 1 Teil Ceresin (einem Paraffin von sehr hohem Schmelzpunkt, etwa 73°, aber sehr zäher Konsistenz) und 19—20 Teilen Paraffin, das bei 42° schmilzt. Der Schmelzpunkt dieses Gemischs liegt etwa bei 55°. Im Sommer fügt man dem Gemisch noch ⅓ gewöhnliches Paraffin von 56° zu oder nimmt Paraffin von 50° mit 2—3% Ceresin. Die Ceresinmischungen sind viel zäher und geschmeidiger als das gewöhnliche, ziemlich brüchige Paraffin von 56°. Man erhält daher sehr schöne Bänder; auch die dünnsten Schnitte falten sich wenig und strecken sich auf dem Wärmeofen vorzüglich. Die Zähigkeit, die dieses Gemisch besitzt, gestattet es, in ihm auch größere Objekte (Eidechsenköpfe etc.) zu schneiden. Da sich das Ceresin in Xylol nur bei Erwärmen auf 40—50° löst, so bringt man die Objektträger in einem Gefäß mit Xylol etwa 20—30 Minuten in den Wärmeofen und wäscht sie vor der Weiterbehandlung in einem zweiten Gefäß mit warmem Xylol ab.

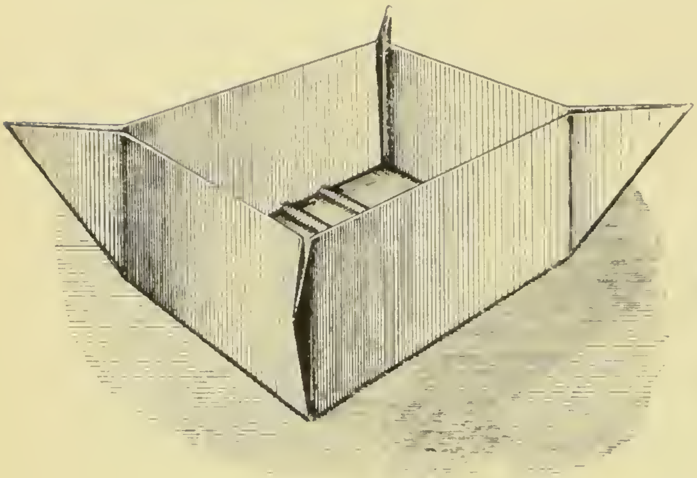
Wem die Verwendung von Ceresin wegen seiner Schwerlöslichkeit nicht zusagt, der koche am besten das gewöhnliche Paraffin, das bei 52—55° schmilzt, etwa 5 Minuten bei starker Flamme in offenem Gefäß. Das Paraffin erhält dadurch eine für das Schneiden in jeder Hinsicht sehr viel bessere Konsistenz, wenn es auch hinter dem Ceresingemisch noch zurückbleibt. Da sich beim Kochen des Paraffins unangenehme Dämpfe entwickeln, tut man gut, jeweils größere Mengen auf Vorrat abzukochen.

Ist das Paraffin völlig in das Objekt eingedrungen und das Intermedium ganz verdrängt und verdunstet, so kann man das Paraffin erstarren lassen. Man tut dies am besten nach folgender Methode:

Zunächst wird aus etwa 0,1 mm dickem, steifem, aber unschwer biegsamem Stanniol ein kleines Schiffchen geformt.

Man bedient sich dazu eines 4 eckigen „Klötzchens“ aus Holz, Blei, Lötmetall oder dergleichen, das 3 verschiedene Rechtecke als Begrenzungsflächen aufweist.

Wir schneiden ein Stanniolstück von etwa 5×6 cm aus, legen das Klötzchen in die Mitte des Stanniolrechteckes und parallel zu seinen Grenzen. Dann schlägt man das Stanniol um die Seitenflächen des Klötzchens in die Höhe und faltet es an den 4 senkrechten Kanten zu 4 Öhrchen aus, von denen man zwei gegenüberliegende noch umknicken kann bis sie einer Seitenwand des Schiffchens anliegen.



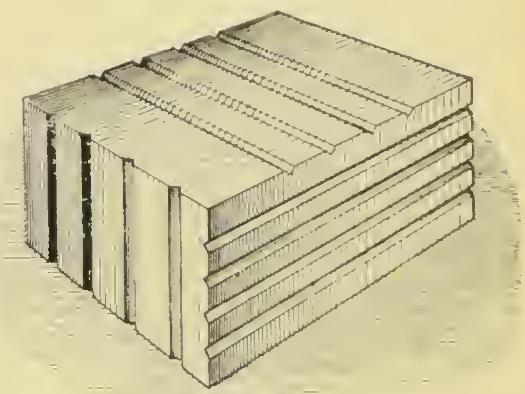


Fig. 2.

Stanniolschiffchen zum Einbetten, natürliche Größe.

Großes Klötzchen mit (etwas zu groben) Rillen.

Nun gießen wir das Schiffchen fast mit Paraffin voll, übertragen das Objekt mit angewärmtem Spatel hinein, legen es in der Mitte zurecht und setzen dann das ganze Schiffchen auf die Wasserfläche einer Schüssel mit kaltem Wasser, worauf es schwimmt. Das Schiffchen wird an den Öhrchen, oder bei Gefahr einer Verbiegung auf einer Glasplatte ins Wasser getragen. Setzt man das Schiffchen auf eine Glasplatte, so hat man außer der leichten Transportfähigkeit noch den Vorteil, daß man durch vorausgegangenes Erwärmen der Platte das Paraffin in dem Stanniolkästchen länger flüssig halten kann. Für genaue Orientierung der

Objekte ist dies oft erwünscht. Kühlt man die Bodenfläche des mit Paraffin gefüllten Kästchens einen Augenblick lang auf einer Wasserfläche oder einer Metall- oder Glasplatte, so bildet sich ein dünner Belag von erstarrtem Paraffin am Boden des Schiffchens, wodurch verhindert wird, daß die nunmehr eingelegten Objekte ganz an den Rand des Paraffinblocks zu liegen kommen. Wird das Stanniolkästchen auf Wasser gesetzt, so erstarrt das Paraffin in dem gutleitenden Metallgefäß sehr schnell; an der Oberfläche kann das dort länger flüssig bezw. weichbleibende Paraffin der Erstarrungskontraktion nachgeben, was man nicht durch zu frühes Untertauchen hindern sollte. Nach ein paar Minuten ist das Paraffin erstarrt, und das Stanniol kann ohne Schwierigkeit aufgefaltet und abgezogen werden. Dann haben wir unser Objekt in einem Paraffinblock eingeschmolzen vor uns.

In solchen Paraffinblöcken kann man die Objekte ohne Schaden beliebig lange aufbewahren.

Wünscht man eine große Anzahl kleinerer Tiere in einem einzigen Block vereint zu schneiden (Cladoceren, Blattläuse etc.), so macht man sich aus dem Stanniol eine Düte mit abgestumpftem Ende. Man erhält dann einen obeliskenförmigen Block, in dessen Spitze sich die Objekte angesammelt finden.

Für das Einbetten von kleinen Objekten kann man auch Uhrschälchen benutzen, die jedoch vorher gut mit Glyzerin einzureiben sind, da sich sonst das Paraffin nicht immer leicht von dem Glas ablöst. Das Glyzerin soll jedoch nur in feinster Schicht das Glas überziehen und nicht in Tröpfchen darauf stehen bleiben.

Zum Einbetten größerer Objekte wendet man auch vielfach die verschiebbaren Metallrahmen an. Zwei rechtwinkelig abgeknickte Metallschienen können, auf eine Glasplatte aufgesetzt, durch gegenseitige Verschiebung ein beliebig langes Kästchen bilden. Alle Flächen, die mit dem Paraffin in Berührung kommen, müssen mit Glyzerin eingerieben

werden. Diese Methode hat der Benützung des Stanniolkästchens gegenüber den Nachteil, daß man bei den dicken Wänden die Abkühlung nicht so vollkommen in der Hand hat und nicht so plötzlich erfolgen lassen kann. Auch fällt bei Benutzung des Stanniols die Verwendung des Glyzerins weg und der Paraffinblock löst sich hier noch leichter ab als von einer gut eingeriebenen Glasplatte. Ferner läßt sich beim Stanniol nicht nur die Länge, sondern auch Breite und Höhe des Kästchens beliebig wählen. Und schließlich können an einem Stanniolkästchen in einfachster Weise Richtlinien angebracht werden.

Mit dem Einschmelzen pflegt man eine genaue Orientierung des Objektes zu verbinden. Die Schnitte, die wir durch ein Objekt legen, werden fast immer viel übersichtlicher und leichter zu deuten sein, wenn sie parallel oder senkrecht zu einer Hauptachse oder einem Hauptorgan des Objektes geführt werden. Nun ist das starre Paraffin ziemlich undurchsichtig; man muß sich daher schon vorher merken, wie jene Achsen oder die gewünschte Schnittrichtung im Paraffinblock liegt. Zu dem Zweck versehen wir unser Klötzchen mit einer Schar scharfer paralleler Rillen, die man leicht in den Boden des Schiffchens abdrücken kann, wenn man dasselbe aus dem Stanniol herstellt. Diese „Richtlinien" bleiben im Boden des Schiffchens, nach ihnen kann man das Objekt in dem noch flüssigen Paraffin mit einer angewärmten Nadel zurechtlegen. Nach dem Erstarren des Paraffins finden wir dann unsere Richtlinien auf dem Paraffinblock wieder, und daraus läßt sich sofort die Lage des Objektes ersehen und die Schnittrichtung einstellen. Ist eine spätere exakte Rekonstruktion des Objektes aus den Schnitten geplant, so streicht man etwas „Nubian Blacking" (einen bei Dr. Grübler, Leipzig und in größeren Schuhgeschäften käuflichen Schuhlack) mit einem Pinsel dünn über die Richtlinien des Paraffinblockes. Diese Farbe überzieht man dann noch wieder durch kurzes Eintauchen der Fläche in (60°—70°)

heißes Paraffin mit einem schützenden Häutchen. Statt des Nubian Blacking kann man auch eine Aufschwemmung der blauen Masse von Schreibstiften für Glas in Chloroform nehmen.

2. Einbettung in Zelloidin (oder Photoxylin).

Zelloidin (reine Schießbaumwolle) oder das ihm nahestehende Photoxylin werden in einer Mischung gleicher Teile von Alkohol abs. und Äther gelöst. Das Zelloidin ist in Tafeln käuflich; diese zerschabt man erst in Späne, die man an der Luft trocknen läßt bis sie gelb und hornig sind. Dann quillt man sie während 24 Stunden in etwas Alkohol abs. auf und setzt darauf das Alkohol-Äthergemisch zu.

Man bereitet zunächst eine 8%ige Lösung, von dieser Stammlösung kann man durch Verdünnung mit Alkohol-Äther eine 4- und eine 2%ige oder eine beliebige Lösung herstellen. Bei kleineren Objekten (etwa 1 cm Durchmesser) kann Vorfärbung mit Chrom- oder Alaunhaematoxylin, Karmalaun, Boraxkarmin, Parakarmin, oder Magnesiakarmin (eventuell Pikrinsäure oder Indigkarmin als 2. Farbe für das Plasma) sehr empfohlen werden.

Vor der Einbettung müssen die Objekte entwässert (in Alkohol abs.) und darauf in Alkohol abs.-Äther-Mischung (1:1) gebracht werden. Dann legt man sie in ein geschlossenes Gefäß mit der dünnsten Zelloidinlösung (2%). Bei sehr durchlässigen kleinen Objekten kann man mit etwas stärkerer Lösung beginnen. In der dünnsten Lösung bleiben kleine Objekte 1—2 Tage, große bis zu Wochen und länger. Danach wird in die mittlere Lösung übertragen, in der das Objekt wieder längere Zeit bleiben muß. Die dickste Lösung wird meist nur zum Einbetten benutzt. Man läßt diese 8%ige (gelegentlich geht das schon mit der 4%igen oder gar der schwächsten) Lösung mit dem Objekt darin etwas eindicken. Zu dem Zweck bedient man sich nicht zu kleiner,

flacher Glasdosen (5—10 cm Durchmesser), die mit eingeschliffenem Deckel gut verschlossen werden können. Zwischen Deckel und Dosenrand bringt man nun an einer Stelle ein Fetzchen Papier, so daß der Alkohol-Äther ganz langsam verdunsten kann. Nun stülpt man noch eine Glasglocke luftdicht über das Gefäß, damit das Eindicken wirklich ganz langsam vor sich geht und oben keine undurchlässige Kruste entsteht. Unter die Glocke (Exsikkator) bringt man außerdem ein offenes Gefäß mit Schwefelsäure, Chlorcalcium oder Phosphorpentoxyd, um der Luft den Wasserdampf zu entziehen. Gleichmäßiges Eindicken ohne vorzeitige oberflächliche Krustenbildung und tadellose Schnittfähigkeit erreicht man nur durch peinlichste Vermeidung von jedem Wasserzutritt. Der verwendete Alkohol-Äther muß durch Zugabe von Natriumdraht, oder gebranntem $Cu\,SO_4$ oder $Na_2\,SO_4$ entwässert werden. Um nicht während des Eindickens (von 8 auf 16%!) nachgießen zu müssen, nehme man reichlich Zelloidinlösung. Das Eindicken dauert mehrere Tage bis wochenlang.

Ist nun bei dem Eindicken die vorläufige Härtung soweit fortgeschritten, daß die Zelloidinmasse dem leichten Druck der Fingerbeere nicht mehr stark nachgibt, so schneidet man mit dem Messer einen viereckigen Block aus dem Zelloidin aus, wobei das Objekt auf jeder Seite noch von einigen Millimetern Zelloidin umgeben bleiben soll.

Dieser noch etwas gelatinöse Block mit dem eingeschlossenen Objekt wird nun einer definitiven Härtung unterzogen. Für diese gibt es verschiedene Methoden. 1. Ist das Objekt noch nicht entkalkt, noch nicht gefärbt oder ziemlich groß (über 1,5 cm Kantenlänge) so bringt man das Objekt zum Weiterhärten in Alkohol von 70% (—85)% (24 Stunden bis wochenlang). Diese Blöcke können dann in 70%igem Alkohol beliebig lange bis zum Schneiden aufbewahrt werden. (Auch kann man die Blöcke in geschmolzenes Paraffin tauchen und dann trocken aufheben). Das Zelloidin ist fast ganz

durchsichtig, das Anbringen von Richtlinien beim Einbetten ist also nicht nötig; später wird man natürlich orientierende Nadelstiche oder eine Richtebene mit Riefen senkrecht zur Schnittebene anbringen. Man trocknet diese Fläche und kann den Nubian Blacking oder die Glasstiftmasse aufstreichen. Handelt es sich um ein Kalk oder Knochen enthaltendes Objekt, das vorher noch nicht entkalkt war, so bringt man den Zelloidinblock in 85 %igen Alkohol + 15 bis 50, meist 25 % Salpetersäure (spez. Gewicht 1,4), nach genügend langer (Tage!) Entkalkung weiter in 70 %igen Alkohol mit präzipitiertem Kalziumkarbonat (oder mit 5 % Natriumsulfat) zum Entsäuren und in reichlich Alkohol von 70 % zum definitiven Auswaschen.

Die in 70 %igem Alkohol gehärteten Blöcke werden „feucht", d. h. unter Alkohol oder mit (Alkohol-) benetztem Messer geschnitten oder durch 90 %igen Alkohol direkt oder besser unter Vermittelung einer entwässernden Alkohol abs.-Chloroformmischung in Terpineol.

Handelt es sich um kleinere, entkalkte und besonders vorgefärbte Objekte, so kann man auch in Chloroform härten. Die Objekte werden darin (durch Spuren von Wasser) zuerst oft trübe, nach längerem Verweilen aber wundervoll durchsichtig. (Gute Härtung erzielt man auch mit Chloroformdämpfen. Zu dem Zweck bringt man ein Schälchen mit Chloroform unter eine Glasglocke, die gleichzeitig auf einer Siebplatte oder sonstwie allseitig zugänglich die Zelloidinblöcke bedeckt. Mit dieser Art der Härtung kann man früh beginnen und die Vorhärtung [siehe oben] zum Teil ersetzen.) Dem Chloroform kann man nunmehr (oder von vornherein) 1—2 Teile Cedernholzöl oder Terpineol zusetzen und endlich in reines Cedernholzöl oder (wasserfreies) Terpineol übergehen. Die Blöcke werden darin noch vollkommener durchsichtig. Diese Art der Zubereitung erlaubt späteres S c h n e i d e n o h n e A n f e u c h t u n g d e s M e s s e r s; das Öl verdunstet so langsam, daß ein Eintrocknen nicht zu befürchten ist.

Terpineol löst etwas mehr Wasser als Cedernöl und gibt dem Zelloidin noch bessere Schneidbarkeit.

3. Doppelte Einbettung in Zelloidin und Paraffin.

Diese für kleine Objekte vortreffliche Methode vereinigt einige wesentliche Vorteile der Zelloidineinbettung (Garantie für Erhaltung normaler Lagerungsverhältnisse, Nichtbrüchigkeit der Masse) und der Paraffinmethode (dünne Schnitte). Sie schließt sich eng an die Einbettung in Zelloidin mit Chloroformhärtung an. Vorfärbung der Stücke ist nicht erforderlich.

Das Objekt wird zunächst in Zelloidin eingebettet, dann in Chloroform definitiv gehärtet oder nach Alkoholhärtung in Chloroform-Alkohol abs. gründlich entwässert und in Chloroform übergeführt. Nachdem es hier völlig durchtränkt und aufgehellt worden ist, schneiden wir den Block unter Chloroform ungefähr in die Form, in der er geschnitten werden soll, nur an der der projektierten Schnittfläche entgegengesetzt liegenden Seite soll reichlich Zelloidin bleiben. Die Schnittfläche und eine auf dieser senkrecht stehende Seitenfläche sollen besonders eben geschnitten und letztere eventuell schon jetzt mit einer geraden, scharfen Längsnute versehen werden. Dies ist für Rekonstruktionen aus den Schnitten notwendig.

Dann wird der Block aus dem Chloroform in der Wärme in Paraffin mit etwas Chloroform und endlich in reines Paraffin gebracht. Nach genügender Durchtränkung (etwa 2 + 2 Stunden) nehmen wir den Zelloidinblock einfach heraus, putzen das anhaftende Paraffin ab und werfen ihn zum Abkühlen in Wasser, wo er weiß und undurchsichtig wird. Später wird der paraffindurchtränkte Zelloidinblock, wie ein Paraffinblock behandelt.

Danach ergibt sich für die Reihenfolge der Prozeduren zur Zelloidin- und Zelloidin-Paraffineinbettung folgendes Schema:

Fixieren — Formolfixierung

Auswaschen des Fixierungsmittels

Konservieren: Alkohol 70%ig ← Formol (10%; von 40%igem Formaldehyd)

Evt. **Entkalken** in 90%igem Alkohol + 5% HNO_3 (od. in Wass m. 5% Trichloressigsäure)

Auswasch. in Alkoh. 70%ig + $CaCO_3$, aus wäss. HNO_3 in Wass. mit Na_2SO_4, dann Wass.

Evt. **Vorfärben** in: Chrom- oder Alaunhaematoxylin, Karmalaun, Parakarmin oder Boraxkarmin

Vorbereitung zum Einbetten

Alkohol 95%ig reichlich; mehrere Stunden

Alkohol absol. mindestens einmal erneuern. (4 Stunden bis 1 Tag und länger)

Alkohol absol. + Äther (1 : 1) mehrere Stunden

2%ige **Lösung von Zelloidin** in Alkohol-Äther in geschlossenem Gefäss. (1 Tag bis Wochen lang)

4%ige **Lösung** " " " " " " " "

Eindicken lassen in 4—8%iger Lösung in Glasdose (5—10 cm Durchmesser) durch geringes Lüften des Deckels Im Exsikkator. (Tage- bis wochenlang)
und **vorläufiges Härten.**

Ausschneiden des Zelloidinblockes zum

definitiven Härten in

Alkohol 70%ig (24 Stunden) → Alk. abs. - Chlorof.

evt. **Entkalk.** in 85%igem Alkohol + 25% HNO_3: Auswaschen in Alkohol 70% + Ca CO_3

beliebig langes Aufbewahren in 70%igem Alkohol oder im Trocknen mit Paraffinmantel

Zuschneiden des Blockes (eine ebene Fläche senkrecht zur Schnittebene) darin 1. Nute " " "

Färben der | Richtebene

Feuchtschneiden, Messer mit 70%igem Alkohol benetzt für grössere Objekte)

Chloroform bis zu völliger Durchsichtigkeit (eventuell vorher Ch.-Dampf)

Chloroform u. Cedernholzöl oder Terpineol

Cedernholzöl oder Terpineol

Zuschneiden des Blockes (eine ebene Fläche senkrecht zur Schnittebene) darin 1. Nute " " "

Färben der | Richtebene

Trockenschneiden oder Messer mit etwas Cedernöl bezw. Terpineol benetzt (für kleinere, besonders für vorgefärbte Objekte)

Zuschneiden des Blockes; eine ebene Fläche mit Nute senkrecht zur Schnittebene

Chloroform Paraffin im Thermostat

reines Paraffin " "

Abputzen u. **Abkühlen** in Wasser

definitives **Zuschneiden**

Färben der | Richtebene

Schneiden nach der Paraffinmethode (für kleinere Objekte, die dünn geschnitten werden müssen)

II. Das Schneiden mit dem Mikrotom und das Aufkleben der Schnitte.

1. Allgemeines über Mikrotome[1], Messereinstellung usw.

Wenn wir nach Fertigstellung der Einbettung uns dem Mikrotom zuwenden, so haben wir, zumal zur Orientierung, unser Interesse auf zwei Punkte zu richten: auf das Messer und auf die Befestigung und Bewegung des Objektes. Diese Teile müssen beim Schneiden gegeneinander bewegt werden: bei einigen Mikrotomen (dem Grundschlitten-Mikrotom von Leitz und dem nach Minot) ist diese Bewegung dem Objekt übertragen, bei den anderen wird umgekehrt das Messer beim Schneiden bewegt. Ferner muß nach jedem Schnitt bezw. vor jedem folgenden ein Aufeinanderzurücken von Objekt und Messer um die gewünschte Schnittdicke stattfinden. Dieses Vorrücken geschieht bei fast allen Mikrotomen von Seiten des Objektes, so daß das Messer entweder ganz feststeht oder jedenfalls während des Schneidens immer in derselben Ebene bewegt wird. Diese Ebene ist bei Hand- und Zylindermikrotomen durch zwei Glasschienen bezw. durch den Tisch gegeben, das Messer wird darauf lediglich mit der Hand gehalten und ziehend durch das Objekt geführt. Bei den Demonstrations-Studentenmikrotomen beschreibt jeder Punkt des Messers bei Bewegung in der Schnittebene einen Kreisbogen; bei den meisten Mikrotomen wird das Messer jedoch geradlinig bewegt, es ist dann auf einem Schlitten befestigt, der zwischen einer senkrechten und einer schrägen Metallbahn gleitet („Schlittenmikrotome") oder supportartig eine horizontale Gleitschiene umklammert („Supportmikrotom").

Von großer Bedeutung ist die Stellung des Messers. Dabei ist auf zweierlei zu achten. Zunächst auf die Stellung der Schneide zur Schnittbahn. Zum Schneiden gefrorener

[1] Bekannte Mikrotomfirmen sind Jung (Heidelberg), Leitz (Wetzlar), Sartorius (Göttingen), Zimmermann (Leipzig) u. a.

Objekte und der meisten Paraffinblöcke wird das Messer „quer", d. h. senkrecht zur Schnittbewegung gestellt. „Studentenmikrotome" gestatten meist nur (ungefähr) quere Messerstellung; sie eignen sich daher nur für Eis- und Paraffinschnitte. Bei fast allen anderen Mikrotomen läßt sich das Messer auch schräg zur Schnittbewegung befestigen, man wählt meist einen Winkel von 45—30 Grad zwischen Schneide und Schnittrichtung. Schrägstellung des Messers ist für Zelloidinschneiden unentbehrlich, es wird ferner gelegentlich bei harten, inhomogenen Objekten in Paraffin und Zelloidinparaffin angewendet. Die Schrägstellung des Messers wirkt nämlich wie eine Verdünnung desselben; die Dicke des Messerrückens wird auf längerem Weg genommen als bei Querstellung. Auch fällt dabei die bei dem Quermesser zuweilen auftretende Zusammenschiebung der Schnitte in der Schnittrichtung fast ganz weg. Das Quermesser bietet aber beim Paraffinschneiden andere große Vorteile, die ihm dort den Vorrang sichern.

Der zweite Punkt betrifft die Stellung des Messers zur Schnittfläche. Steht das Messer zu steil zu dieser Ebene, so kann es vibrieren und kratzt (zumal bei härteren Objekten) anstatt weich zu schneiden. Andererseits darf man den Winkel zwischen Messerebene und Schnittebene auch nicht zu klein machen. Als Grundregel gilt nämlich: *es darf kein Teil des Messers (z. B. der Rücken) mehr gegen die Schnittebene vorragen als die Schneide*, andernfalls würde ja das Objekt von dem mehr vorspringenden Teil gestreift und eventuell gedrückt und geschädigt werden. Dies ist besonders bei den auch an der Blockseite hohlgeschliffenen Messern, die zuweilen bei Minotschen Mikrotomen gebraucht werden, zu beachten. Aber auch die übrigen Messer, bei denen wenigstens die dem Objekt zugekehrte Seite plangeschliffen ist, müssen mit dem Rücken weiter vom Block entfernt werden als man zunächst denkt. Das liegt an der sogenannten „Fazette" der Messerschneide.

Um nämlich beim Schleifen eines Messers nicht die ganze Fläche abtragen zu müssen, umgibt man den Rücken der Messer dabei mit einer an einer Seite offenen Röhre.

Unsere untenstehende Figur läßt erkennen, wie dadurch an der Schneide zwei Flächen entstehen, die einen etwas größeren Winkel bilden als die Hauptflächen des Messerkeiles. Wenn also das Messer mit der hinteren Fazettenkante nicht die Schnittfläche des Blockes drücken soll, so muß das Messer gegen die Schnittfläche mindestens ebenso stark geneigt sein, wie es auf dem Schleifstein bei Anwendung der Abziehvorrichtung geneigt ist. Bei Anwendung biegsamer Streichriemen wird die Fazette noch steiler.

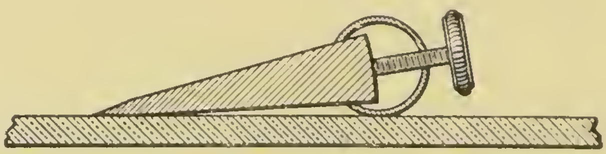


Fig. 3. Entstehung der „Fazette" beim Abziehen des Messers mit der Abziehvorrichtung (nach Schiefferdecker).

Man kommt für alle Zwecke mit einfach keilförmigen Messern aus, doch sind für Paraffin und besonders für Zelloidin auch plan-konkav geschliffene in Gebrauch. Sie haben etwas dünnere Schneide und sind daher leicht zu schleifen. Bei diesen Messern stellt man immer die konkave Fläche vom Objekt ab. Bei stark konkaven Messern vertritt der vorspringende Rücken auf der hohlen Seite die Abziehvorrichtung, man braucht also beim Schleifen nur die andere Seite des Rückens etwas zu erhöhen. Dies geschieht durch Anbringen eines Drahtes, der mit Vorrichtung zum Anschrauben versehen ist.

Die Mikrotommesser nach Thoma und Weigert haben eine Art Handgriff, mit dem sie (bei Schlitten- und Supportmikrotomen) direkt auf den Messerschlitten mit einer Schraube befestigt werden können. Diese Messer sind so

geschliffen, daß die plane, nach untengekehrte Seite dazu gleich richtige Neigung hat. Die handgrifflosen Messer

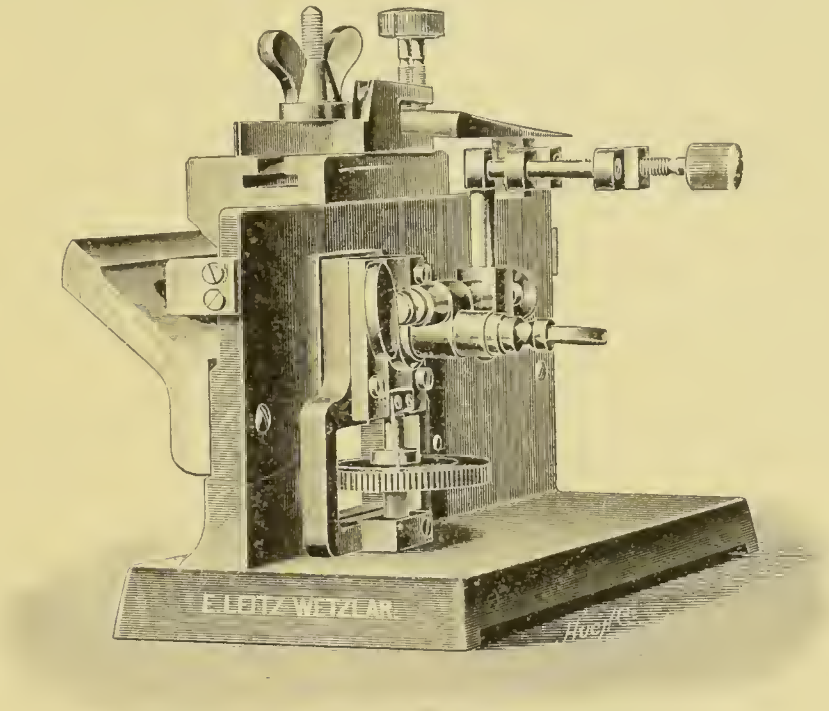


Fig. 4. Kleines Schlittenmikrotom.

werden auf den Schlittenmikrotomen mittels besonderer Klemmen befestigt. Die Klemme wird mit ihrem Gabelteil

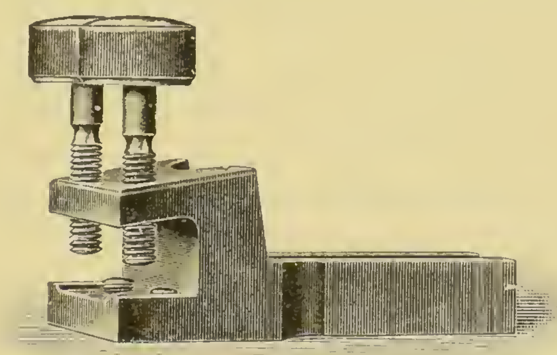


Fig. 5. Einfache Messerklemme.

unter der Mutter des Messerschlittens festgeschraubt. Die handgrifflosen Messer werden nun zwischen den Backen der Klemme befestigt und sie können in ihrer Neigung gegen

die Ebene des Schnittes verstellt werden. Gegenüber den großen oberen Schrauben der Messerklemme besitzt die untere Backe der Klemme nochmals 2 kurze (mit Schraubzieher verstellbare) Schrauben; je höher wir dieselben vorschrauben, je steiler wird das Messer stehen. Es werden auch Klemmen mit noch bequemerer Verstellung und Ablesung der Messerneigung hergestellt. Bei vielen Mikrotomen sind Klemmen am Mikrotom vorhanden, die eine ganz entsprechende Stellvorrichtung haben. Sind die Schrauben einmal richtig eingestellt, so läßt man sie am besten ein für allemal in der Stellung stehen.

Der Objektteil der Mikrotome besteht im wesentlichen aus einem Schlitten, der durch eine Mikrometerschraube bewegt wird. Diese Schraube besitzt eine genaue Teilung (in 0.01; 0,005 oder 0,001 mm d. h. 10 μ; 5 μ oder 1 μ), so daß man durch Drehen um einen oder mehrere Teilstriche das Objekt um den gewünschten Betrag gegen das Messer vorschieben kann. Diese Verschiebung wird bei vielen großen Mikrotomen automatisch vor jedem Schnitt vollzogen, so daß man die gewünschte Schnittdicke an einer Skala nur einzustellen und nachher die Schnittbewegung auszuführen braucht. Die größte einstellbare Schnittdicke beträgt meist 20 oder 25 μ; will man noch dicker schneiden, so muß man die automatische Hebeeinrichtung zweimal arbeiten lassen, bevor man den Schnitt durchführt. Alle automatischen Hebungen beruhen darauf, daß beim Rückweg der Schneidebewegung oder zwischen zwei Schnitten die mit Zähnen versehene Mikrometerschraube um eine Reihe von Zähnen von einem „Mitnehmer" gedreht wird; beim Zurückgehen des mitnehmenden Hakens setzt dieser aus, so daß die Hebung nicht wieder rückgängig gemacht wird. Dieses Mitnehmen wird nun durch die Einstellvorrichtungen auf eine beliebige Zahl von Teilstrichen beschränkt. Alle diese Einrichtungen sind ohne weiteres verständlich. Die Mikrometerschraube läßt sich — eventuell nach Aus-

schaltung der automatischen Hebung — zurückschrauben, wenn sie allmählich zu weit vorgekommen war. Als allgemeine Regel für Objekthebung beachte man, daß sie immer erst dann vollzogen werden darf, wenn das Objekt nach dem Schneiden wieder der Messerschneide und nicht mehr dem Rücken gegenübersteht. Andernfalls tritt Quetschung des Objektes beim Zurückführen des Messers ein.

Auf dem Schlitten, der von der Mikrometerschraube verschoben wird, sitzt der Träger für das zu schneidende Objekt. Er besteht für Paraffinpräparate am besten aus einem Eisentischchen mit rundem Stiel, das in verschiedener Höhe festgeschraubt werden kann; für Zelloidinschnitte ist eine Klemme mit Schraube vorhanden, für Gefrierobjekte werden besondere Einsätze gebraucht; alle diese Teile werden meist mit ihrem Stiel wie das einfache Paraffintischchen eingesetzt.

Bei Demonstrations- und Handmikrotomen ist das Objekttischchen oder die Klemme oft nur in der Höhe verschiebbar und um seine Achse drehbar. Man muß hier also dafür sorgen, daß die untere Fläche des Paraffinblockes, die auf das Tischchen aufgeklebt werden soll, der Schnittebene vorher parallel gemacht wird. Wird das Objekt jedoch vorher auf Holz oder Stabilit befestigt und in die Klemme gebracht, so besteht etwas größere Freiheit für die Orientierung[1].

Bei allen größeren Mikrotomen ist das Tischchen (bezw. die Klemme) durch ein Kreuzkopfgelenk mit dem Schlitten verbunden oder es ist eine Neapler Klemme vorhanden; diese Einrichtungen gestatten Drehung um zwei aufeinander senkrecht stehende Achsen, so daß man noch nach dem

[1] An Stelle des einfachen Paraffintischchens kann vielfach eine „Neapeler Klemme" eingeschraubt werden. Die Objekte werden auf ein Holz- oder Stabilitklötzchen geschmolzen, eingespannt und können nun durch zwei Schrauben in zwei aufeinander senkrecht stehenden Ebenen gedreht und sehr genau orientiert werden.

Aufkleben oder Einspannen des Blockes die gewünschte Schnittrichtung in die Messerebene einstellen kann. Am vollkommensten ist das Grundschlittenmikrotom in bezug auf Orientierungsmöglichkeit ausgerüstet: hier ist eine Kugelgelenkklemme vorhanden, die neben der Beweglichkeit nach allen Richtungen noch den Vorteil bringt, daß das Objekt seinen Ort bei einer Drehung in beliebiger Richtung möglichst wenig ändert.

Sind gewünschte Schnittebene und Messerebene parallel orientiert, so bringt man sie vor dem Schneiden dadurch zum Zusammenfallen, daß man das Objekttischchen oder die Klemme an einem Stiele höher oder tiefer festklemmt. Bei den großen Leitz'schen Instrumenten (Grundschlitten-, Großem Schlitten- und Minotmikrotom) kann diese Verschiebung noch einfacher dadurch geschehen, daß man die den Objektschlitten tragende geteilte Mikrometerschraubenmutter mit der Zange von der Spindel abhebt und in passender Höhe wieder ansetzt.

Außerdem mag darauf hingewiesen werden, daß man sich nach richtiger Einstellung von Messer und Objekt vor dem Schneiden überzeugen soll, daß alle in Frage kommenden Schrauben gut angezogen sind. Nur dann kann die Stabilität erreicht werden und die genaue Fixierung aller Teile, die zur Herstellung gleichmäßiger dünner Schnitte erforderlich sind. Beim Grundschlittenmikrotom wählt man den Abstand der das Messer tragenden Säulen so klein wie möglich; so wird ein eventuelles Vibrieren des Messers eingeschränkt. Ferner hat man auf Sauberkeit aller Teile zu achten. Paraffinschnitzel kleben besonders gern am Metall fest an, sie müssen vor allem von Mikrometerspindel und Gleitbahn, von Messer- oder Objektschlitten sorgfältig entfernt werden (ev. mit etwas Xylol durchtränktem Lappen). Die Gleitbahnen sind gleichmäßig aber nicht zu dick einzufetten. Die Mutter der Mikrometerspindel soll nicht schlottern. doch auch nicht zu fest angezogen sein. Nach Gebrauch des Mikrotoms, besonders nach dem Schneiden von Zelloidin, wobei eine Über-

schwemmung mit stark wasserhaltigem Alkohol (70%) unvermeidlich ist, muß eine sorgfältige Reinigung vorgenommen werden. Rostflecken und dergl. schädigen natürlich die Ebenheit der Bahnen und damit die ganze Leistung in bedenklicher Weise.

2. Das Schneiden von Paraffin und Zelloidinparaffin. Weiterbehandlung der Paraffinschnitte.

Der aus dem Erstarrungsschiffchen genommene Paraffinblock ist gewöhnlich für das Schneiden zu groß; die großen Schnitte sind schwerer herzustellen und es würden nur wenige Schnitte auf einen Objektträger gehen. Wir schneiden daher den Block zu. Man darf dabei nicht einfach ein starkes Messer durch das Paraffin durchdrücken; das Paraffin würde dabei brechen, und solche Brüche können unregelmäßig laufen, das Objekt treffen und so erheblich schaden. Am besten ritzt man den Block längs der Linien, nach denen man ihn zuschneiden möchte, mit einer kräftigen Nadel. Man ritzt immer tiefer und hat den Block sehr bald durchgetrennt. Dann erst kann man die Flächen mit dem Messer genauer abschaben. Mit dem Zuschneiden geht man so weit, daß auf jeder Seite des Objektes noch eine etwa 1½—2 mm dicke Paraffinschicht vorhanden ist. Im allgemeinen schneidet man den Block ungefähr parellel-epipedisch zu; bei langen dünnen Objekten, die quer geschnitten werden sollen, läßt man ihn nach der Basalseite hin etwas dicker, um ein Brechen durch den Messerdruck zu vermeiden.

Die Basalfläche des Blockes soll eine größere Entfernung (mindestens 5 mm) vom Objekt haben als die anderen Endflächen; diese Fläche wird nämlich bei dem Aufschmelzen auf das Paraffintischchen des Mikrotoms etwas abgeschmolzen. Wenn wir die Basalfläche des Einbettungskästchens als Richtfläche benutzten und auf derselben Richtlinien anbrachten, so darf diese Fläche nicht verschnitten werden. Wir richten vielmehr nach ihr die übrigen. In Richtfläche

und Richtlinie ist das Objekt gewöhnlich so gelegt, dass die Schnittrichtung senkrecht auf der Richtlinie stehen soll. Wir schneiden also zunächst eine Ebene parallel zu dem ersten Schnitt der das Objekt treffen soll und legen diese Ebene möglichst genau senkrecht zu Richtlinien und Richtebene. Gegenüber der Schnittfläche wird dann die Basalfläche in 5 mm Abstand vom Objekt gleichfalls senkrecht zur Richtlinie zugeschnitten. Die übrigen Flächen sind von geringerer Bedeutung (s. Fig. 6).

Nunmehr schrauben wir ein Paraffintischchen auf das Mikrotom in ungefähr horizontaler Stellung und schieben

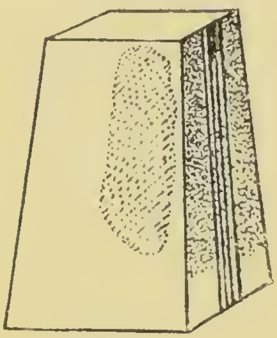


Fig. 6.
Zugeschnittener Paraffinblock mit gefärbter Richtebene und Richtlinien.



Fig. 7. Blechspatel zum Aufschmelzen.

das Messer möglichst bei Seite. Dann erhitzen wir ein Stück etwa ½—1 mm dicken Blechs von Spatelform (s. Fig. 7) am breiten Ende in der Bunsenflamme, drücken dasselbe auf das Paraffintischchen (zum Anwärmen), legen schnell einige Paraffinbröckchen darauf und schmelzen dieselben zu einer einheitlichen Paraffingrundlage auf dem Tischchen durch Aufdrücken mit dem heißen Spatelende fest. Während diese dünne Paraffinlage erstarrt, nehmen wir den zugeschnittenen Block, fassen ihn mit einer Pinzette oder mit den Fingern am Oberende, erhitzen wieder den Spatel und fahren nun mit demselben über die Paraffinfläche des Tischchens und dann schnell unter der Basalfläche des Blockes her.

Darauf drücken wir den Block mit seiner Basisfläche sofort auf das Mikrotomtischchen auf. Bei Demonstrations- und Handmikrotomen ohne Orientierungseinrichtungen ist genau darauf zu achten, daß dabei die provisorische Schnittfläche parallel (oder die Richtfläche senkrecht) zur Tischchenfläche kommt. Bei den anderen Mikrotomen ist das auch erwünscht, doch läßt sich dort ja durch das Kreuzkopf- oder Kugelgelenk später Parallelität von projektierter Schnittfläche und Messerebene erreichen. Gleich nach dem Aufschmelzen läßt sich der Block auch noch um eine Kleinigkeit zurechtdrücken. Dann kommt das Tischchen samt dem Block



Fig. 8.

zur Abkühlung in eine Schale mit Wasser. Wenn die Färbung und Überkleidung der Richtebene noch nicht vorher ausgeführt wurde, so hat sie jetzt zu erfolgen.

Inzwischen stellen wir das Messer des Mikrotoms quer, so daß die Schneide genau senkrecht zur Bahn steht. Das ganze Instrument wird geprüft und in Stand gesetzt. Dann wird das Tischchen mit dem Objekt abgetrocknet und nahezu in Höhe der Messerschneide eingeschraubt. Wir drehen das Tischchen so, daß das Objekt dem Messer seine kleinste Breite zukehrt (s. Fig. 8) und daß die vordere Kante der Schneide parallel liegt. Ist dagegen eine in anderer

Richtung größer ausgedehnte harte Stelle im Objekt vorhanden, so kann Drehung derselben in die Schnittrichtung von Nutzen sein. Im allgemeinen schneidet man am besten, wenn die härtesten Stellen dem Messer mit ihrer geringsten Breite entgegentreten (s. Fig. 8). Doch ist bei ganz harten Objekten überhaupt Schrägstellung des Messers oft empfehlenswerter.

Dann stellt man die Messerschneide gerade über den Block und schiebt den letzteren bis dicht an die Schneide vor. Nun wird von verschiedenen Seiten visiert, ob die projektierte Schnittebene parallel zur Bewegungsebene der Messerschneide liegt. Ist das nicht der Fall, so muß mit Hilfe von Verstellung von Kugel- oder Kreuzkopfgelenk Parallelität hergestellt werden.

Wenn dies erreicht ist, heben wir das Objekt auf dem Tischchen oder mit Mikrometerschraube bezw. der Mutterzange bis direkt unter die Schneide. Beim Verschieben mit der Schraube oder der Zange muß darauf geachtet werden, daß noch genug Raum auf der Spindel bleibt, um nachher das ganze Objekt mit der Schraube Schnitt für Schnitt bis zum Ende heben zu können.

Nunmehr kann man die ersten Schnitte machen. Man stellt auf die gewünschte Schnittdicke ein, und versucht zu schneiden (etwa 5—20 μ). Die ersten Schnitte mißlingen oft; ihr Umschlagen über das Objekt verhindert man mit einem leise aufgedrückten Papierstückchen oder Pinsel. Man läßt den ersten gelungenen Schnitt auf der Messerkante hängen. Beim Weiterschneiden setzen sich dann die folgenden Schnitte meist an die vorhergehenden an, schieben sie nach dem Messerrücken zu und bilden zusammen ein mehr oder weniger langes Band. Dann entfernen wir durch eine Reihe besonders dicker Schnitte das Paraffin, das noch über dem Objekt liegt und beginnen nun das eigentliche Schneiden des Objektes. Zuerst macht man wiederum noch einige leere Schnitte über dem Objekt, damit die ersten Objekt-

schnitte nicht die immer gefährdeten ersten Schnitte sind. Schnurren die Schnitte zu einer engen Rolle zusammen, so wählt man besser etwas geringere Schnittdicke oder man sucht durch in die Nähestellen eines Bunsenbrenners die Härte des Paraffins etwas herabzusetzen. Wie bemerkt, eignet sich Paraffin von 45—50° am besten zu Schnittdicken von 25—10 μ, solches von 55—60° zu Schnitten von 7—2½ μ. Im heißen Sommer verschieben sich diese Verhältnisse etwas, man nimmt etwas härteres Paraffin. Es besteht also nach dem Einbetten nicht mehr immer freie Wahl inbetreff der Schnittdicke. Im allgemeinen genügt für die anatomische Untersuchung zumal bei größeren Objekten eine Dicke von 20 μ; für kleinere Objekte dürfte 10 μ die gebräuchlichste, für feine histologische Zwecke 5 μ die geeignetste Schnittdicke sein. Bei ganz kleinen Gegenständen von homogener Struktur kann man für manche Zwecke ohne Schwierigkeit bis zu 2½ μ herunter gehen. Dünner zu schneiden gelingt nur selten und hat auch nur sehr selten Zweck (Protoplasmastruktur); man bestreicht dann die Schnittfläche vor jedem Schnitt mit einer dünnen Lösung von Schellack in Alkohol abs. (oder mit Paraffin oder 1% Zelloidin), um das Reißen der äußerst dünnen Blättchen zu verhindern.

Wenn die Schnitte geraten und sich gut aneinander schieben, so nimmt man sie am Messerrücken im Zusammenhang ab, am besten mit lanzettenförmigen Messerchen. Man läßt jedoch immer ein paar Schnitte am Messerrand, damit die neuen Schnitte gleich Anhalt finden und sich nicht rollen können.

Das Minotsche Mikrotom (s. Fig. 9) ist speziell für das Schneiden langer zusammenhängender Bänder eingerichtet. Die Schnitte rutschen hier über das senkrecht stehende Messer nach unten. Man nimmt das Band über einen Präpariernadelstiel mit der linken Hand und zieht es langsam weiter, während das einfache Drehen einer Kurbel immer neue Schnitte liefert und in ein paar Minuten ein großes Objekt

in eine Schnittserie zerlegt. Auch kann man das Band auf einer „Bandführung", d. h. einem Riemen ohne Ende immer weiter bewegen. Das Minot-Mikrotom ist zum Schneiden gut schneidbarer Objekte unübertrefflich und spart sehr viel Zeit; für diffizile Sachen, bei denen keine Serien entstehen, ist es weniger geeignet als andere Instrumente (obwohl auch hier Schrägstellung des Messers möglich ist).

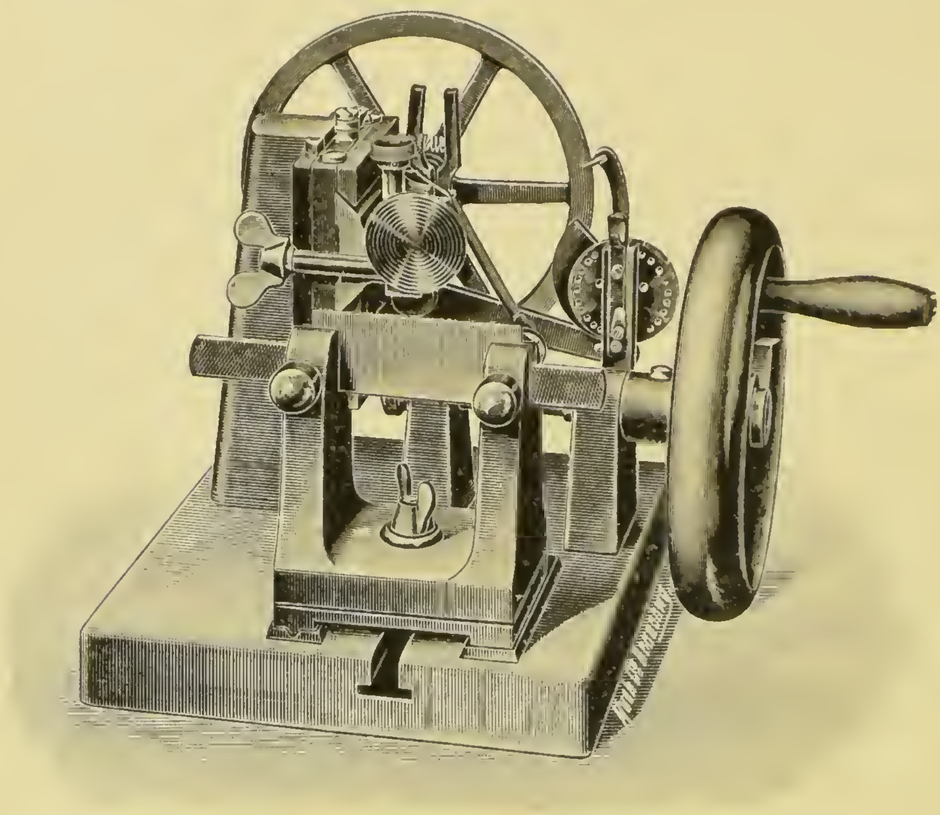


Fig. 9. Minotsches Mikrotom (von E. Leitz).

Dickere Schnitte von härterem Paraffin (55—60°) fügen sich meist nicht zu Bändern zusammen, das harte Paraffin klebt zu wenig. Man kann dem dadurch abhelfen, daß man den ganzen aufgeschmolzenen Block am Stiel des Paraffintischchens nimmt und nun für einen Augenblick in flüssiges Paraffin von niedrigem Schmelzpunkt (42°) taucht. Der dadurch entstehende Mantel ergibt klebrigere Säume der Schnitte.

Die kurzen oder größeren Schnittbänder (länger als 30 cm sollte man sie nie werden lassen) legt man mit 2 Lanzetten, die man unterschieben oder mit denen man den Schnittrand anstechen kann, in ihrer Reihenfolge auf Fließpapier oder am besten auf eine große Linoleum-Platte. Man beachte, daß die Oberseite der Schnitte matt, die Unterseite glänzend ist und lege immer die matte Oberseite nach oben. Von einem reichlich großen Staubkasten bedeckt, kann man die Schnitte gut ein paar Stunden liegen lassen.

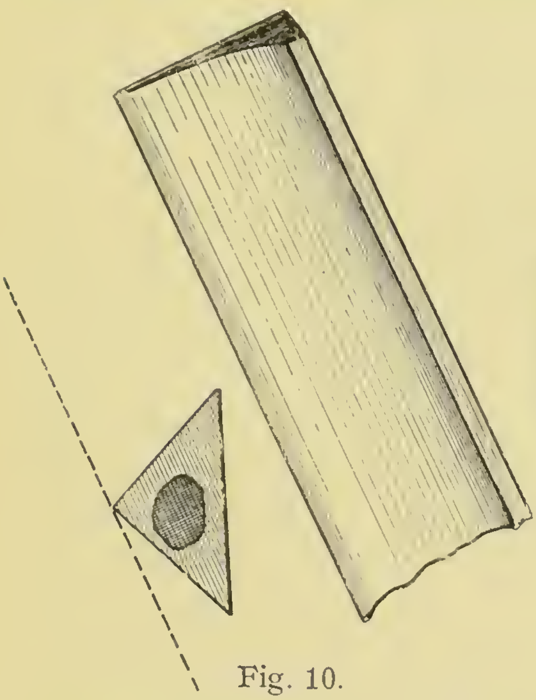


Fig. 10.



Fig. 11.

Natürlich muß man sie vor jedem Windhauch (Atem!) schützen. Auch kleben die Schnitte manchmal fest an die Unterlage an. So ist es jedenfalls geraten, sie so bald als möglich weiter zu bearbeiten.

Schneiden mit schrägem Messer. Schneidet sich ein Objekt schlecht, so gehen wir zur Schrägstellung des Messers über. Das Schrägmesser „zieht" mehr durch die Objekte und schneidet daher harte Gegenstände besser. Parallelstellung von Blockkante und Messer ist dann überflüssig; da man jeden Schnitt einzeln abnimmt, so ist es sogar

meist zu empfehlen, den Block zu einem dreikantigen Prisma zuzuschneiden (s. Fig. 10), der dem Messer eine größere Paraffinzone zukehrt. Das Messer schneidet dann erst Paraffin, so daß man mit einem Pinsel glätten kann und tritt an einem Punkt aus dem Block aus, so daß der Schnitt nicht fest an der Messerkante haftet und leicht abgenommen werden kann. (Auch wenn man beim Schneiden mit dem Quermesser jeden Schnitt abnehmen will, kann man mit Vorteil dem Messer eine Kante des Blockes zu- und eine abkehren [s. Fig. 11].)

Man hebt die einzelnen Schnitte durch Anstechen (am Rand) mit der Lanzette oder mit leicht angefeuchtetem Pinsel ab.

Das Schneiden von Zelloidinparaffin.

Die Zelloidinparaffinblöcke werden genau so aufgeschmolzen und geschnitten wie Paraffinmaterial. Man kann auch genau so dünne Schnitte machen, wie bei reiner Paraffineinbettung; bei kleinen geeigneten Objekten bis 2 μ. Dabei ist die Masse weniger brüchig und elastischer. Bänder erhält man beim Schneiden der doppelt eingebetteten Objekte nur bei geringer Schnittdicke. Man arbeitet daher auch gern mit dem Schrägmesser.

Weiterbehandlung der Paraffinschnitte. Aufkleben.

Aus den Schnitten muß das schlecht durchsichtige Paraffin durch ein Lösungsmittel (Xylol, Chloroform) entfernt werden; dabei würden aber in sehr vielen Fällen die Teile des Schnittes ihren Zusammenhang verlieren, Zerreißungen und Verschiebungen erfolgen. Deshalb klebt man die Schnitte auf die Objektträger fest noch bevor das Paraffin gelöst ist. Dies ist besonders vorteilhaft, ja meist ganz unentbehrlich, wenn die Schnitte noch gefärbt werden sollen, also noch verschiedene Flüssigkeiten passieren müssen. Nach dem Aufkleben löst man dann das Paraffin weg, der

Schnitt ist nun mit allen seinen Teilen auf dem Glas festgelegt und so kann in bequemster Weise damit hantiert werden.

War das Objekt schon in Haematoxylin oder Karmin vorgefärbt, so braucht nach dem Aufkleben nur noch das Paraffin durch Xylol entfernt zu werden, dann kann sofort ein Tropfen Kanadabalsam zugegeben und das Deckglas aufgelegt werden. Wenn große, dicke glatte Schnitte vorliegen, so kann man in diesem Falle mit Kollodium (1. Vol. auf 3—4 Vol. Nelkenöl) aufkleben. Die Lösung wird dünn auf den Objektträger gestrichen, dann die Schnitte aufgelegt, angedrückt und endlich auf dem Wasserbad bei etwa 35° das Öl verdunstet. Dann kleben die Schnitte und das Paraffin kann entfernt werden.

Als allgemeine Methode empfehlen wir dagegen das „Aufkleben mit Wasser" oder mit „Eiweißglyzerin und Wasser".

Das Aufkleben mit Wasser beruht auf der festen Adhäsion von Schnitt und Glas, die eintritt, wenn eine kapillare Wasserschicht zwischen beiden durch Verdunstung allmählich entfernt wird (siehe auch p. 110). Die Methode wird folgendermaßen angewendet. Frische (ungebrauchte) Objektträger werden in Seifenlösung gestellt (eventuell Tage lang vorher). Auf den Arbeitstisch zeichnen wir uns den Umriß der gebrauchten Objektträger und tragen in diesen Umriß denjenigen der zur Anwendung kommenden Deckgläser in der



Fig. 12. Umriß von Objektträger und Deckgläschen auf dem Arbeitstisch.

Mitte ein (s. Fig. 12). Für Einzelpräparate gebraucht man kleine, für Schnittserien möglichst große Deckgläser (bis

25×50 auf Objektträger 26×76). Dann nehmen wir einen Objektträger aus der Seifenlösung, reiben ihn naß kräftig ab, spülen ihn dann rein und trocknen ihn mit reinem Tuche. Ein gut gereinigter Objektträger muß sich beim Anhauchen gleichmäßig beschlagen (nach dem Reiben erst abkühlen lassen). Nun legen wir ihn auf unseren Umriß und streichen mit einem Pinsel oder Glasstab von oben links einen Streifen destilliertes Wasser parallel der oberen Deckglaszone. Dieses Wasser darf sich nicht in einzelne Tröpfchen zusammenziehen, sondern muß sich gleichmäßig ausbreiten (andernfalls erneutes Reinigen)! Dann legen wir die ersten Schnitte, die das Objekt getroffen haben, der Reihe nach von links nach rechts in den Wasserstreifen, wobei wir darauf achten, daß alle Schnitte ihre matte Seite nach oben haben! Die in einer Linie nebeneinander gelegten Schnitte sollen auf jeder Seite einige Millimeter von der Deckglasgrenze entfernt bleiben; sie dehnen sich nämlich später noch aus. Wenn die erste Reihe voll ist, ziehen wir einen neuen Wasserstreifen und fangen wieder links an. So geht es fort bis der ganze Deckglasraum belegt ist. Hat man zu viel Wasser genommen, so schwimmen die Schnitte leicht durcheinander. Man ordnet sie mit einer Nadel. War zu wenig genommen, so kann man jetzt einen Tropfen unterfließen lassen. Dann nehmen wir den Objektträger und legen ihn auf das (ebene!) Tischchen eines Wasserbades, das auf 35—42° erhitzt sein soll. Das Wasser erwärmt sich hier, das Paraffin der Schnitte wird weich, und da sie schwimmen und ganz unbehindert sind, so strecken sie sich in der vollkommensten Weise. Sie dürfen unter keinen Umständen schmelzen, da dabei sehr häufig ein Auseinanderweichen der Schnittteile und sonstige Schädigungen der Gewebe auftreten. Sind die Schnitte gut gestreckt (die nicht seltene Zusammenschiebung der Schnitte gleicht sich dabei wieder aus), so ziehen wir an einer Seite das Wasser mit Fließpapier ab, ordnen die Schnitte noch einmal definitiv und saugen dann den letzten nicht kapillar

gebundenen Wasserrest weg. Dann bekommt der Objektträger, wenn es sich um eine längere Serie handelt, in einer bestimmten Ecke (z. B. links unten) seine Nummer (mit Ölstift, Glastinte oder Schreibdiamant) und wird zum Trocknen gelegt.

Das Trocknen soll nicht zu schnell geschehen. Am besten legt man die Objektträger auf einen auf etwa 25° eingestellten Wärmtisch (Wasserbad) oder in einen so regulierten Thermostaten. Dann verdunstet das zwischen Glas und Schnitten kapillar gehaltene Wasser allmählich und zieht die letzteren außerordentlich eng und fest an die Unterlage. Das Trocknen sollte immer einen halben Tag dauern, oft kann man die Schnitte allerdings schon nach ein paar Stunden weiterbehandeln. Besser ist es aber, die Schnitte einen Tag und länger an staubfreiem Orte liegen zu lassen.

Diese Methode ist an Reinlichkeit und Sicherheit für die meisten Objekte ideal; sie sollte immer angewendet werden, wenn die Objekte vorgefärbt waren und nachher nicht mehr (oder nur in Xylol-Pikrinsäure) nachgefärbt werden sollen. Aber auch wenn die Schnitte in wässerigen Lösungen gefärbt werden sollen, ist diese Methode meist die beste. Nur bei Objekten mit einzelnen dünnen Chitinlamellen, sowie nach Fixierung mit Osmiumsäure greifen wir zu einer Modifikation: zum Aufkleben mit Eiweiß und Wasser.

Man mischt 50 ccm Eiweiß und 50 ccm Glyzerin, gibt 1 g Natriumsalizylat zu und filtriert. Von dieser Lösung bringt man ein kleines Tröpfchen (keinen Tropfen!) auf den Objektträger und reibt es mit der reinen Fingerbeere über die Deckglaszone des Objektträgers äußerst dünn aus. Dann bringt man Wasser darauf und verfährt genau wie bei der Wassermethode. Das Wasser breitet sich auf dem Eiweiß tadellos aus, man braucht also die Objektträger nicht so sorgfältig zu reinigen. (Man kann auch — wenn keine Streckung und Glättung — nötig ist, die Schnitte direkt auf

das Eiweiß andrücken und dann die Klebmasse über die Flamme vorsichtig koagulieren.) Nach dem Aufkleben mit Eiweißglyzerin darf man nicht sofort aus dem paraffinlösenden Xylol in Balsam gehen, sondern muß das in Balsam Trübungen gebende Glyzerin vorher durch Alkohol entfernen. Bei sehr intensiver Plasmafärbung kann sich das Eiweiß — zumal wenn es zu dick aufgetragen wurde — etwas mitfärben.

Die Weiterbehandlung der aufgeklebten Schnitte hat folgendermaßen zu erfolgen. Zunächst wird das Paraffin aufgelöst; dazu werden die Objektträger mit den Schnitten in Rillentröge oder in etwa 10 cm hohe Glaszylinder gebracht, die Xylol oder Chloroform enthalten (Dauer: 1 bis wenige Minuten).

War das Objekt in toto gefärbt und der Schnitt ohne Glyzerin aufgeklebt, so kann dann sofort Kanadabalsam zugegeben und ein Deckglas aufgelegt werden. Eine Doppelfärbung zu Vorfärbung mit Haematoxylin oder Karmin erhält man, wenn man aus dem Xylol in eine Lösung von Pikrinsäure in Xylol geht (1 bis wenige Minuten); dann in reinem Xylol abspült und Balsam und Deckglas daraufbringt. Auch kann man aus dem Xylol in Alkohol abs. mit darin gelösten Plasmafarbstoffen z. B. Eosin oder Lichtgrün (letzteres für Karminvorfärbung) gehen (wenige Minuten), in reinem Alkohol abs. abspülen und dann wieder den Weg: Xylol—Kanadabalsam—Deckglas gehen. Auch so entstehen schöne Doppelfärbungen.

War der Schnitt noch ungefärbt, so müssen wir durch wässrigen Alkohol auf dem Weg: Xylol—Alkohol 96 %[1] — Alkohol 70 % — Alkohol 50 % in Wasser. Alle diese Flüssigkeiten werden in jenen Zylindern oder Trögen bereitgehalten und die Schnitte nach dem Auflösen des Paraffins

---

[1] Hier ist der meist gebrauchte Alkohol abs. nicht nötig! Doch darf man an seiner Stelle nicht Alkohol unter 96 % verwenden.

auf den Objektträgern durchgeführt (in jeder Flüssigkeit wenige Minuten). Aus dem Wasser gehen wir dann in die Farblösung.

Vorschriften für einige Färbungen. (Ausführliches darüber siehe im speziellen Teil.) Man färbt mit Karmin-, Haematoxylin- oder Teerfarbstoffen. Die wichtigsten Karminfarbstoffe wurden oben schon erwähnt. Schnitte brauchen meist nur kürzere Zeit gefärbt zu werden. Nach Karmalaun wird mit 2% Alaunlösung, dann in dest. Wasser und endlich in Leitungswasser ausgewaschen. In alkohol. Boraxkarmin, das nur langsam färbt und sich weniger für Schnittfärbungen eignet, gehen wir direkt aus Alkohol 70%. Ausgezogen wird hier mit Salzsäurealkohol (70%iger Alkohol mit ½% H Cl), dann Alkohol 70%. Nach Karminfärbung kann man mit Pikrinsäure in Xylol oder mit Wasserblau oder Lichtgrün in Alkohol abs. nachfärben.

Von Haematoxylinfärbungen wird am häufigsten Haematoxylin nach Boehmer-Hansen gebraucht. Schnitte werden oft in wenigen Minuten (oder noch weniger Zeit) gefärbt. Dann kann man (wenn reine Kernfärbung erwünscht ist) mit Alaunlösung (2%ig), später mit dest. Wasser auswaschen und mit Leitungswasser „bläuen". Nachfärbung mit Eosin in Wasser (besser noch vor dem Haematoxylin anwenden, Konzentration beliebig), mit Orange G. in Alkohol abs. (oder Vorfärben mit wässr. Orange) oder mit Pikrinsäure in Xylol. Für manche Zwecke (Kernstudien etc.) ist bei dünnen Schnitten (10 μ und darunter) Eisenhaematoxylin ausgezeichnet: die Schnitte kommen aus Wasser für 6—12 Stunden in 2½%ige Lösung (klarer violetter Kristalle) von Eisenalaun (schwefelsaurem Eisenoxyd-Ammoniak; nicht erwärmen), und nach Abspülung mit Wasser in eine alte, wässrige ½—1%ige Haematoxylinlösung (bis 24 Stunden und länger), werden dann wieder gewaschen und zurück in den Eisenalaun gebracht, in dem sie sich langsam entfärben (sie waren im Haematoxylin schwarz geworden).

Wenn der gewünschte Grad der Entfärbung erreicht ist (unter dem Mikroskop kontrollieren), bringt man die Schnitte auf etwa ½ Stunde in fließendes Wasser zum Waschen. Nachgefärbt wird in kräftigen Lösungen von Wasserblau, Lichtgrün, Säurefuchsin oder Bordeauxrot in Wasser.

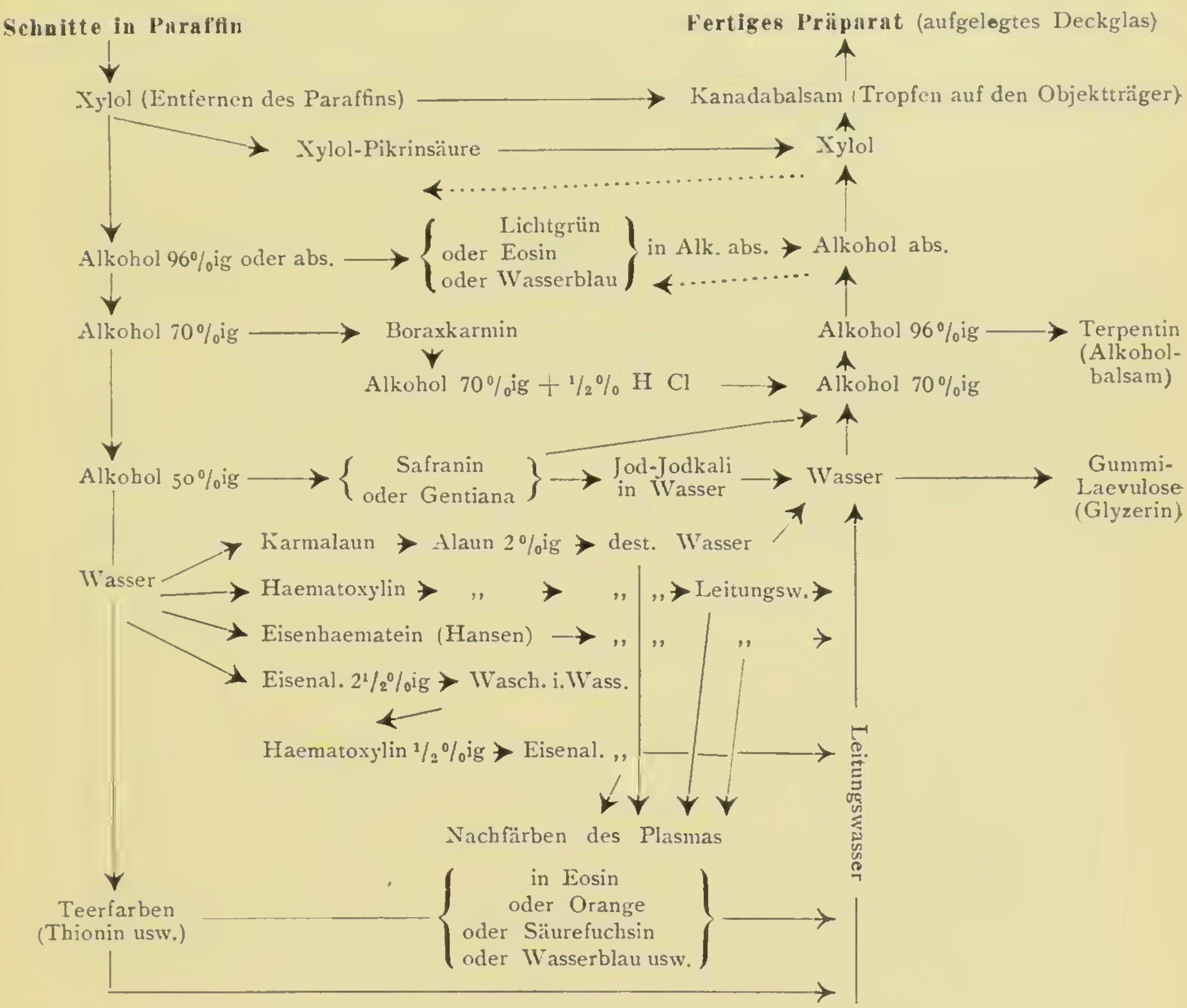
Mit Osmiumsäure (oder O.-gemischen) fixiertes Material färbt man am besten mit Eisenhaematoxylin oder mit Teerfarben, die aber auch sonst gute Färbungen geben. Viele Teerfarben verblassen in den Präparaten rasch, so das sonst überaus schöne und bequeme blaue Thionin. (Man färbt in konzentrierter oder dünnerer Lösung in Wasser, 1%igem Karbolwasser oder 2%igem Anilinwasser, spült in Wasser ab, entfärbt in 70% Alkohol soweit man wünscht, geht dann in 96% Alkohol — Alk. abs. — Xylol-Balsam). Haltbar sind die Färbungen mit Safranin und Gentianaviolett.

Das (rote) Safranin O (von Grübler und Hollborn in Leipzig) wird in Wasser (mit 2% Anilin) event. mit 50% Alkohol abs. konzentriert gelöst. (Man kann auch ganz dünne Lösungen in Wasser nehmen). Die Färbung wird mit Alkohol 70%, ev. mit 1‰ H Cl (oder mit Methylalkohol) differenziert; oft zieht aber schon Alkohol an sich zu stark aus. Man kann aus der Farbe in konzentrierte Lösung von Pikrinsäure in Alkohol gehen; nach dem Alkohol abs. gießt man Nelkenöl auf den Schnitt zum differenzieren und geht dann in Balsam. Gentianaviolett wird ebenfalls in wässeriger Lösung (oder in 50% Alkohol gelöst) gebraucht. Wenn zu starke Entfärbung in Alkohol eintritt, so geht man vorher in Wasser mit ⅓% Jod und ⅔% Jodkalium. (Dieses Mittel ist auch beim Safranin anwendbar.) Eventuell Nachfärbung in Orange.

Allgemein gilt, daß die Schnitte, wenn sie in Kanadabalsam eingeschlossen werden sollen, aus der meist wässerigen Färbungsflüssigkeit die Reihe der Alkohole: 50%iger — 70%iger — 96%iger — abs. hinauf und durch Xylol hindurch-

geführt werden müssen, ehe sie in Balsam und unter das Deckglas gebracht werden können. Kanadabalsam löst sich in Xylol, dieses mischt sich aber nicht mit Wasser, so daß Entwässerung in Alkohol abs. unumgänglich ist.

Unsere Bemerkungen über das Färben lassen sich kurz in dem Schema zusammenfassen:



3. Das Schneiden der Zelloidinblöcke.

Zelloidin wird immer mit stark schräggestelltem Messer geschnitten, der Winkel zwischen Schneide und Schnittbahn kann 45—25° oder noch weniger betragen. An Stelle des Paraffintischchens setzen wir die Schraubenklemme auf den Objektschlitten der Mikrotome.

Die Zelloidinblöcke werden am besten auf Stabilitklötzchen aufgeklebt, die mit Riefen versehen sind. Stabilit wird zur elektrischen Isolierung benutzt, es ist daher leicht zu beschaffen. Dieses Material ist besser als Holz, das in Alkohol quillt, manchmal Luftblasen ins Zelloidin abgibt und jedenfalls vor dem Gebrauch mit einer härteren Zelloidinschicht überzogen werden muß. Zum Aufkleben geben wir einen kräftigen Tropfen stärkster Zelloidinlösung (ev. mit 25 % Benzylbenzoat) auf den Klotz, trocknen die Basalfläche des Zelloidinblockes ab, feuchten sie leicht mit Alkohol-Äther an und drücken sie fest auf die Stabilitfläche mit dem Zelloidintropfen. Wenn eine Seite als Richtfläche ausersehen und mit Richtfurche versehen war, so bestreicht man sie jetzt mit der Farbe und schließt letztere durch einen aufgegossenen, ausgebreiteten Zelloidintropfen von der Außenschicht ab. Dann kommen die in Alkohol gehärteten Blöcke für kurze Zeit mit dem Klötzchen in Alkohol 70 %, die Chloroformgehärteten in Chloroformdampf.

Nunmehr kann das Stabilitklötzchen in die Mikrotomklemme geschraubt werden. Dabei achten wir schon darauf, daß die provisorische Schnittfläche der Bewegungsebene des Messers ungefähr parallel wird. Nach dem Einschrauben wird definitiv orientiert.

Die in Alkohol gehärteten Blöcke werden unter Alkohol oder mit Alkohol benetztem Messer geschnitten. Man bringt deshalb mit einem dicken Aquarellierpinsel reichlich Alkohol 70 % auf Block und Messerschneide und erneuert diese Benetzung nach jedem Schnitt. Bequemer läßt sich die Benetzung mit einem Tropfapparat erreichen (einem Kessel mit verstellbarem Ablaufhahn). Man stellt den Hahn so, daß der Tropfen nahe der Schneide auf das Messer fällt; vom Messer fließt dann bei jedem Schnitt genug Alkohol auf den Block. Von Sartorius in Göttingen werden sog. Tauchmikrotome hergestellt, bei denen Objekt und Messer unter Alkohol liegen, so daß direkt in der Flüssigkeit geschnitten wird.

Die Schnitte werden während des weiteren Schneidens in Alkohol 70% (— 90%) aufbewahrt, und zwar legt man am besten immer so viele, wie auf einen Objektträger zusammen sollen, in ein enges „Salznäpfchen" übereinander; man muß natürlich so viele Salznäpfchen haben, wie Objektträger gebraucht werden. Sehr praktisch sind zu diesem Zwecke auch größere Aquarellierpaletten mit zahlreichen runden Vertiefungen. Die Vertiefungen werden numeriert und in jede eine kleine Anzahl Schnitte übereinander gelegt (in wenig Alkohol 70%). Man überträgt die Schnitte mit einer feinen Pinzette, mit der man sie an einer vom Objekt freien

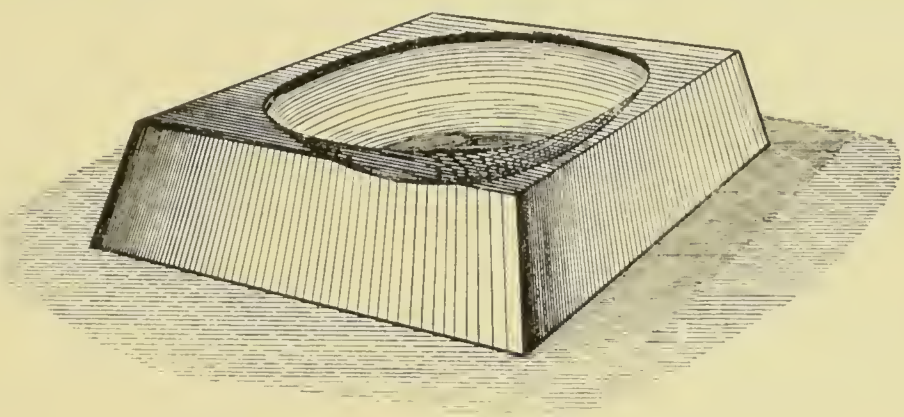


Fig. 13. Salznäpfchen, nat. Größe.

Ecke faßt. Das Zelloidin braucht aus den Schnitten nicht entfernt zu werden. Die natürliche Lage der Teile wird also tadellos erhalten. Das ganz durchsichtige Zelloidin hindert die Beobachtung nicht. Auch färbt es sich beim Nachfärben der Schnitte nicht nennenswert mit.

Man kann die Schnitte in Salznäpfchen einzeln färben und sie dann direkt in Glyzerin oder Laevulose, durch Alkohol 70%—90% in Terpentin (keine zarten Teerfarben und Haematoxylinfärbungen!) oder Alkoholbalsam oder aus 90%igem Alkohol in Chloroform-Alkohol abs. (1:1), weiter in Xylol und dann in Balsam bringen. Das Einschließen in Terpentin ist nach Vorfärbung in Boraxkarmin sehr zu empfehlen. Man schneidet unter 70—80% Alkohol (färbt ev. in 95% Alkohol

mit etwas Lichtgrün und Pikrinsäure nach), spült in 95% Alkohol ab und legt in Terpentin ein, der das Zelloidin vollkommen aufhellt.

War dagegen das Objekt nicht vorgefärbt, so ist es am besten, die Schnitte aufzukleben. Von den vielen Methoden zum Aufkleben raten wir zu dem sehr zuverlässigen Gelatineaufkleben nach Olt. Man löst 10 g Gelatine in 100 ccm Wasser (klärt event. durch gerinnendes Eiweiß) und setzt 10 ccm 5%iger Karbollösung zu (= Phenolgelatine). Davon streicht man (ähnlich wie beim Eiweißaufkleben der Paraffinschnitte) eine Kleinigkeit mit der Fingerbeere auf der Deckglaszone des Objektträgers ganz dünn aus, legt die Schnitte in richtiger Reihenfolge (und immer dieselbe Seite nach oben; auf Richtfurche achten!) auf und preßt sie mit einem nassen Stück Fließpapier glatt an (ev. durch Aufdrücken eines zweiten Objektträgers). Dann taucht man ein Stückchen Fließpapier in 10%ige Formaldehydlösung und drückt dieses mit einem Objektträger auf die Schnitte fest an. Die Gelatine wird dann durch das aus dem Papier austretende Formol gehärtet. Um noch sicherer zu gehen, kann man die Härtung nach Entfernung des Papiers durch Einstellen der Objektträger in 10%ige Formaldehydlösung (kurze Zeit) noch vollkommener machen.

Nunmehr können wir die Zelloidinschnitte ebenso färben und weiterbehandeln wie die aufgeklebten Schnitte aus Paraffin. Nur an einer Stelle, nämlich beim Entwässern ergeben sich Schwierigkeiten. Zelloidin löst sich nämlich in absolutem Alkohol. Das Zelloidin soll jedoch in dem Schnitt bleiben, nur dadurch gibt ja diese Methode die besten Garantien für Erhaltung der Lageverhältnisse im Schnitt. Wir bringen daher die Objektträger aus 85—90%igem Alkohol gleich in eine Mischung von Chloroform und Alkohol abs. (1:1). Der absolute Alkohol entwässert, während das härtende Chloroform die Lösung verhindert. Dann folgen Xylol und endlich Kanadabalsam und Deckglas.

Man kann die Alkoholblöcke auch mit Glyzerin durchtränken (etwa 1 Tag), dann mit Glyzerin benetztem Messer schneiden und in Glyzerin oder Glyzeringelatine einschließen.

Die in Chloroform gehärteten und in Cedernöl gebrachten Blöcke werden mit trockenem oder mit etwas Cedernöl benetztem Schrägmesser geschnitten. Auch die Blöcke, die in Terpineol gebracht wurden, werden trocken, oder unter Anfeuchtung durch Terpineol geschnitten. Man kann die Schnitte aus Cedernöl oder Terpineol sofort in Balsam legen; oder wenn Nachfärbung der (in Haematoxylin oder Karmin vorgefärbten) Schnitte erwünscht ist, sie in Pikrinsäure in Chloroform (oder Xylol) bringen, in reinem Xylol (oder Chloroform oder Cedernöl) abspülen und sie endlich in Balsam und unter das Deckglas bringen. Entwässern und Aufkleben fallen bei dieser für kleinere vorgefärbte Objekte empfehlenswerten Methode weg.

III. Die Anfertigung von Gefrierschnitten.

Die Gefriermethode ist indiziert, wenn man in kürzester Zeit histologischen oder pathologisch-histologischen Aufschluß über einen Organteil braucht. Das Hauptfeld der Methode liegt also auf pathologischem Gebiet; die Forderung einer Schnelldiagnose kann oft allein mit ihrer Hilfe erfüllt werden. Dagegen bietet das Schneiden auf dem Gefriermikrotom nicht die besten Aussichten für tadellose Erhaltung der Lageverhältnisse der Teile im Schnitt und sie ist ganz unzuverlässig, wenn man eine lückenlose Serie von Schnitten von einem Objekt herstellen will.

Fast jedes Mikrotom kann durch Einsetzen eines Gefriertischchens statt eines Paraffintischchens in ein Gefriermikrotom verwandelt werden. Einfachheit ist eines der Hauptorfordernisse für ein Mikrotom, das zur Herstellung von Gefrierschnitten dienen soll. Man muß die Aufmerksamkeit ganz auf das Gefrieren selbst richten können und dieses genau überwachen, daher wählt man am besten ein handliches

Mikrotom. Demonstrations- und Handmikrotome sind besonders geeignet; letztere werden in einer Modifikation so hergestellt, daß sie nach Bardeen direkt auf die Kohlensäureflasche, deren Inhalt zum Abkühlen benutzt werden soll, aufgeschraubt werden können. Da man bei Gefrierschnitten

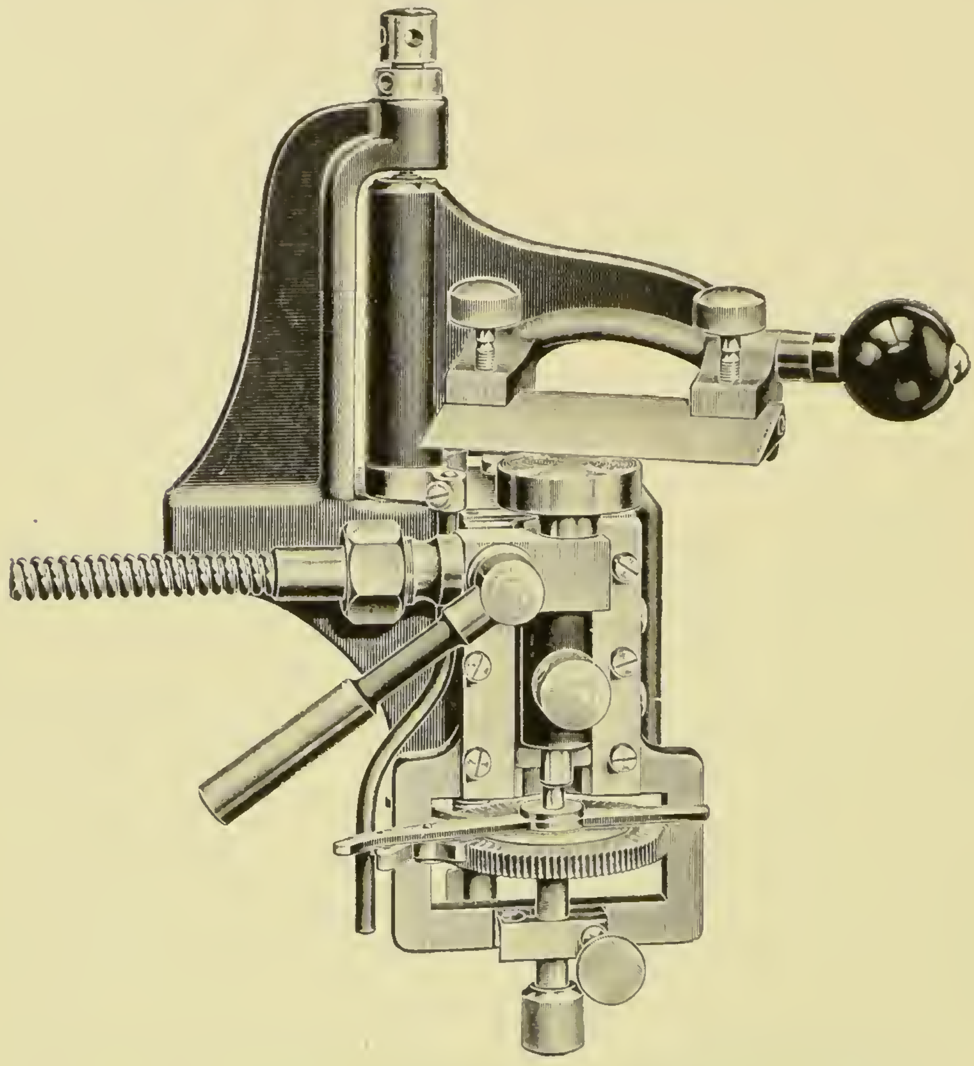


Fig. 14. Demonstrationsmikrotom mit Gefriertischchen für Kohlensäure.

gewöhnlich keine lückenlosen Serien erstrebt, so wird oft von einer mechanischen Messerführung abgesehen und nur die Schnittebene durch zwei Glasschienen festgelegt (Bardeen'sches und Handmikrotom).

Die zum Gefrieren nötige Temperaturerniedrigung erzielt man durch Verdunstung von Äther (oder Äthylchlorid) oder durch Ausdehnung stark komprimierter Kohlensäure. Bei dem Ätherapparat wird durch ein Gebläse der Äther aus einem Gefäß gedrückt und von unten gegen die Platte des Gefriertisches zerstäubt. Objekte von weniger als 4 mm Dicke gefrieren dabei sehr schnell, zumal wenn die Temperatur des Arbeitsraumes nicht allzu hoch ist. Bei dem Kohlensäuregefrierapparat strömt das stark komprimierte Gas durch den eigenen Druck gegen die Unterfläche des Objekttisches; bei ihrer Ausdehnung entnimmt die Kohlensäure der Umgebung sehr schnell eine große Menge Wärme, so daß das Gefrieren noch erheblich schneller als bei der Ätheranwendung vonstatten geht. Dementsprechend kann man auf dem Kohlensäuregefriertisch Stücke bis über 1 cm Höhe und von sehr großer Fläche leicht zum Erstarren bringen.

Das Schneiden von frischem Material.

Bei sehr großer Eile führt das Schneiden des frischen Objektes am schnellsten zum Ziele. Man schneidet aus dem Objekt, wenn es als Ganzes zu groß ist, Scheiben von etwa 3 mm Dicke heraus und legt sie auf den Gefriertisch, der vorher am Objektteil des Mikrotoms eingesetzt worden ist. Die Unterseite des Objektes muß von Gewebssaft oder Blut reichlich angefeuchtet sein, andernfalls muß man vorher extra mit einem Tropfen Blut oder aber mit frischem Eiweiß Tischchen und Unterseite des Objektes benetzen. Auch kann man das Objekt von allen Seiten von Eiweiß umfrieren lassen. Anstelle von Eiweiß wird zu demselben Zwecke vielfach auch eine dickflüssige Lösung von Gummiarabikum oder von Gelatine genommen.

Bei frischen Geweben soll man die Temperatur nicht allzutief sinken lassen; menschliches Blut gefriert schon bei —0,57, die übrigen Gewebe zwischen —0,57 und —0,9 Grad. Man geht mit der Temperatur etwa so weit herunter, daß die

obersten Partien des Objektes noch nicht ganz fest sind. Diese Zone schneidet man dann ev. weg. Aber auch die unterste durch Eiskristalle weißgrau gewordene Schicht ist weniger gut als die mittlere Zone, die schon gut schneidbar, aber nicht durchkristallisiert ist. Im allgemeinen wird man sich an eine Schnittdicke von 30—20 μ halten, doch gestatten manche Objekte eine sehr viel geringere Schnittdicke. Das Messer wird vor dem Schneiden zweckmäßig abgekühlt. Vielfach wird mit trockenem Messer geschnitten, doch ist es empfehlenswert, das Messer mit einer Flüssigkeit anzufeuchten; beim Schneiden frischer Gewebe nimmt man natürlich am besten physiologische Kochsalzlösung (0,75 %). Dann überträgt man die Schnitte direkt auf einen Objektträger, um sie im eigenen Gewebssaft oder in Kochsalzlösung oder in einem anderen indifferenten Beobachtungsmittel zu untersuchen. Diese Untersuchung der nie mit einem Fixierungsmittel in Berührung gewesenen Schnitte kann für manche Gegenstände (Zelleinschlüsse) große Vorteile bieten.

In den meisten Fällen aber wünscht man ein Dauerpräparat. Dazu muß natürlich zunächst fixiert werden. Die Fixierung führt man am besten dadurch aus, daß man einen großen Tropfen der Fixierungsflüssigkeit auf den auf dem Objektträger liegenden Schnitt bringt. Nach kurzer Zeit (einige Minuten genügen bei dünnen Schnitten gewöhnlich) wird der Tropfen abgesogen und je nach dem Fixierungsmittel mit Wasser oder Alkohol nachgespült. Dann kann man den Schnitt färben, und zwar muß das wiederum in einem aufgelegten Tropfen geschehen. (Man nehme etwa Alaunkarmin, Haematoxylin, oder Thionin eventuell mit schwachem Eosin oder Lichtgrünzusatz oder spezielle Bakterien- oder Protozoenfärbungen.) Darauf muß wiederum mit dest. Wasser gespült und endlich durch die steigende Reihe der Alkohole und durch Xylol in Balsam geführt werden. Bei sehr großer Eile kann man nach der Färbung

und dem Abspülen mit Wasser direkt einen Tropfen Glyzerin oder Gummi-Laevulose und dann ein Deckglas darauf bringen.

Bei Anwendung von Laevulose oder Glyzerin läßt sich ein Schnitt in etwa 15 Minuten nach dem Schneiden unter dem Mikroskop demonstrieren.

Will man aber in Balsam überführen, so kann man sich die Manipulationen mit dem nicht aufgeklebten Schnitt dadurch vereinfachen, daß man ein mit einem kleinen Wachsfüßchen an den 4 Ecken versehenes Deckglas über den Schnitt auf den Objektträger legt und nun die Flüssigkeiten von der Seite zuströmen läßt bezw. nachher wieder absaugt.

Noch besser ist es, den Schnitt vom Mikrotommesser auf einen mit Phenolgelatine (vergl. oben) bestrichenen Objektträger zu bringen, ihn dort mit einem in Formol (etwa 10—25%) getränkten Fließpapierstückchen anzudrücken (und damit gleichzeitig zu fixieren) und zum weiteren Erhärten der Gelatine in 10%ige Formaldehydlösung zu bringen (Olt). Nachher läßt er sich dann wie ein gewöhnlicher Schnitt weiter behandeln.

Anfertigung von Gefrierschnitten von fixiertem Material.

Objekte, die schon fixiert worden sind, müssen vor dem Gefrieren in Wasser gebracht werden. Dann werden sie direkt oder mit Hilfe von Eiweiß, Gummiarabikum, oder Gelatine (etwa 5%ige) auf dem Gefriertisch festgefroren. Auch hier kann man das Objekt mit einer dickflüssigen Lösung dieser Medien umfließen lassen. Die Schnitte fängt man am besten in 1%iger Gelatinelösung (mit schwachem Karbolzusatz) auf und bringt sie auf einen Objektträger, wo sie nach der Olt'schen Methode durch Härtung der Gelatine in Formol aufgeklebt und dann wie aufgeklebte Paraffin- oder Zelloidinschnitte weiterbehandelt werden.

Es sind verschiedene Methoden erdacht worden, die die Erstarrung der Objekte erleichtern. An erster Stelle ist da die Behandlung mit Formol zu nennen. Man fand, daß das Gefrieren nach Fixierung in 10% Formol (= 4% Formaldehyd) besonders gut ging. Die Formollösungen gefrieren leichter, geben allerdings ein etwas weniger hartes Eis. (Man kann sogar nach Döllken das Formol durch Resorcin bis zu Schnittfähigkeit härten.) Objekte, die nicht ohnehin zum Fixieren und Aufbewahren in Formol waren, kann man noch nachträglich in die 10% Formollösung bringen bis sie in derselben untersinken (Material aus Alkohol schwimmt nämlich zuerst). Dann wäscht man die Hauptmenge des Formols in Wasser wieder weg und geht zum Gefrieren über.

Neben Formol ist auch Anisöl (von Schimmel in Leipzig) zur Erleichterung des Gefrierens gebraucht worden. Es erstarrt je nach Alter bei 6—21 Grad und muß eventuell durch leichtes Erwärmen erst verflüssigt werden. Man trocknet die durch Alkohol geführten Objekte außen gut ab, bringt sie auf etwa 24 Stunden (bei 2 mm Dicke) in das Öl, gefriert und schneidet dann und entfernt endlich das Öl mit abs. Alkohol aus den Schnitten.

Endlich kann man auch Durchtränkungen der Objekte vor dem Schneiden auf dem Gefriermikrotom vornehmen. Sie verhindern gewöhnlich das Kristallisieren des Eises. Man verwendet zu diesem Zweck ziemlich dicke Lösungen von Gummiarabikum, von Gelatine, Dextrin oder Eiweiß. Mit der ganz dicken Lösung umhüllt man nachher noch das ganze Objekt. Bevor man in den Gummischleim überführt, kann man durch eine Zuckerlösung hindurchgehen (2 Teile Zucker auf 1 Teil Wasser) oder gleich eine Lösung von Gummi in Zuckersaft nehmen. Auch sind Mischungen von Gelatine und Gummiarabikum empfohlen worden. Olt benutzt eine Lösung von Agar in Formol und sucht so die Vorteile der beiden Substanzen für die Gefriertechnik zu vereinigen.

Einschlussmittel.

Wir wissen heute, daß der Weg, der von dem lebenden Objekt zu der für die Beobachtung und Erhaltung des Untersuchungsobjektes günstigsten Montierung, zum Dauerpräparat, führt, in ganz verschiedene Etappen zerlegt werden muß. Noch vor hundert Jahren glaubte man ihn mit einem Schritt zurücklegen zu können, suchte man nach Universalmitteln, die die Objekte mit einem Schlage vor Zerfall schützen und sie zur Beobachtung geeignet machen sollten. Eines der am ersten und am meisten gebrauchten Universalmittel bestand im Trocknen der Präparate. Noch heute besitzen wir in der Herstellung von Trockenausstrichen für Bakterien- und Protozoen-Präparaten eine Methode, die an jenes primitive Verfahren erinnert. Die Unzulänglichkeit des Austrocknungsverfahrens liegt auf der Hand und blieb auch damals schon nicht verborgen, obwohl die damaligen optischen Hilfsmittel noch nicht eine so vernichtende Bloßstellung der Mängel derselben gestatteten, wie unsere verbesserten Mikroskope. Man hat auch damals schon durch Firnissen mit Terpentin oder durch Einlegen der Trockenpräparate in Harze weiter zu kommen gesucht, ohne damit natürlich den einmal herbeigeführten schlechten Erhaltungszustand verbessern zu können. Schon damals ist der Kanadabalsam zu diesem Zwecke als Einschlußmittel (Bond und Cooper 1832) benutzt worden, der heute eine so dominierende Rolle unter den Einschlußmitteln einnimmt, damals aber höchstens durch seine aufhellenden Eigenschaften nützen konnte, die durch fehlende Fixierung und durch die Schrumpfung bedingten Fehler aber nicht gutzumachen vermochte. In der Tat ist die Mikrotechnik auch erst nach einem gewaltigen Umweg zu diesem Mittel zurückgekehrt.

Sieht man von Fixierung, Konservierung und Differenzierung ab, also von Leistungen, die man zu Unrecht von den Einschlußmitteln erwartete, so bleiben im wesentlichen zwei Anforderungen bestehen: unveränderliche Aufbewahrung

und Aufhellung, d. h. Vergrößerung der Durchsichtigkeit, die zumal früher, wo man auf Quetschpräparate und dicke Schnitte angewiesen war, sehr in Betracht kam.

Der Grad der Aufhellung hängt vom Brechungsexponent des Einschlußmittels ab. Ist dieser gering, so wird an den Oberflächen der einzelnen Fasern und Bestandteile des Objektes eine starke Brechung stattfinden, die das Licht ablenkt und einen Teil desselben verhindert, in das Objektiv aufgenommen zu werden. Ein Einschlußmittel mit höherem Brechungsindex, der etwa demjenigen der Gewebsbestandteile gleichkommt, wird im Gegenteil die Brechungsdifferenzen mehr oder weniger ausgleichen, zumal, wenn das Mittel in die Fasern usw. selbst aufgenommen wird. Die Folge ist ein ziemlich geradliniger Durchtritt des von unten kommenden Lichtes und eine größere Helligkeit des Bildes. In einem Idealfalle könnte die Vereinheitlichung soweit gehen, daß die einzelnen Gewebsbestandteile in dem Einschlußmittel ebenso verschwinden würden, wie ein Glasstab in dem eingedickten Cedernholzöl vom Brechungsexponent des Glases. In diesem Falle müßten die einzelnen Teile des Objektes durch ihr verschiedenes Absorptionsvermögen, also durch Färbung gegen das Einschlußmittel abgehoben werden, wenn sie überhaupt im mikroskopischen Bilde erscheinen sollten, und in der Tat hat die Verwendung stark lichtbrechender Einschlußmittel (Harze) die Ausbildung einer besonderen Färbetechnik nach sich ziehen oder wenigstens stark fördern müssen. Ein solches reines „Absorbtionsbild", das nur auf der Verschiedenheit der Färbung beruhte, bekommen wir freilich so gut wie nie zu Gesicht. Einige schwache Brechungsdifferenzen bleiben und bringen es zum Beispiel mit sich, daß eine dicke Faser, ein Skelettstäbchen oder dergleichen wie Sammellinsen wirken und über ihrer Mitte eine helle Brennlinie erzeugen, während ihr Rand durch die Konvergenz der Strahlen dunkel erscheint. So bekommen im mikroskopischen Bilde die Fasern usw. infolge der nicht

völlig gehobenen Refraktionsunterschiede gewöhnlich mehr oder weniger breite dunkle Säume, die die Deutlichkeit eines Teiles sehr erhöhen können, andererseits aber zu dicke Konturen vortäuschen. Diese von dem Anteil der Refraktion an dem Bilde beeinflußten Täuschungen dürfen nicht zu stark werden. Auch aus diesem Grunde ist daher die Wahl eines höheren Brechungsindex beim Einschlußmittel im allgemeinen zu empfehlen. Im einzelnen kann natürlich gelegentlich eine geringere Aufhellung bei wenig färbbaren Objekten die Beobachtung erleichtern und daher indiziert sein.

Im allgemeinen aber muß es nach dem Gesagten doch als ein wesentlicher Fortschritt bezeichnet werden, als man gegen Ende der dreißiger Jahre des vergangenen Jahrhunderts zum Einschluß in flüssigen Medien überging. Die Goadby'sche Flüssigkeit (1839) war wohl die erste, die auf diesem Gebiet Anklang fand. Sie bestand aus einer $^1/_{100}$ %igen Sublimatlösung in Wasser mit etwa 5% Alaun und 10% Kochsalz. Der Brechungsindex war freilich noch zu niedrig, und die konservierenden Eigenschaften waren noch viel schlechter. Der Vorteil der Flüssigkeit lag eigentlich mehr in den fixierenden Eigenschaften der Sublimatlösung, nicht in der Konservierungsfähigkeit derselben. Mit der Fäulnis, die durch den Sublimatzusatz verhindert wurde, war durchaus nicht ein anderweitiges Verderben des Objektes ausgeschlossen, das auch in der Tat mit der Zeit auftritt. Andere Einschlußmittel benutzten die fäulnishindernden Eigenschaften von Kampher, Karbolsäure und Kreosot oder auch Alkohol in sehr dünnen Lösungen, wesentlich mit demselben Erfolg; wenig später traten konzentriertere Lösungen von Alkalien (Ätzkali usw.), Säuren (Chromsäure, Salycilsäure, Essigsäure, Holzessig, arsenige Säure) und besonders starke Salzlösungen mehr in den Vordergrund. Von den Säuren waren einige gute Fixierungsmittel und eigneten sich zum Teil auch für nicht zu lange Aufbewahrung; für dauernde Montierung eines mikroskopischen Präparates hatten sie indessen alle,

auch vom zu geringen Brechungsvermögen abgesehen, schlechte Eigenschaften. Dagegen fand man unter den zahlreichen damals angewendeten Salzlösungen (Kaliumbichromat usw.) wenigstens einige, nämlich die stark konzentrierte Chlorkalzium- ($n = 1,404$) und die Kaliumazetatlösung ($n = 1,370$), die mit einer Steigerung der Aufhellung auch sonst günstige Eigenschaften verbanden. Erstere wurde von Botanikern, letztere (in der sich Teerfarben gut halten sollen) von Zoologen viel benutzt (eingeführt von M. Schultze). Von weit größerer Bedeutung aber wurde für die Mikrotechnik das Aufkommen des Glyzerins als Einschlußmittel etwa seit 1860; auch dieses Mittel war schon viel früher, nämlich in den vierziger Jahren in England zuerst empfohlen worden.

Das gewöhnlich benutzte konzentrierte Glyzerin hat den Brechungsindex 1,47, also recht beträchtliche Aufhellungsfähigkeit und dabei geringe Farbenzerstreuung, es ist fast keiner Zersetzung und Veränderung unterworfen und gibt eine vortreffliche Aufbewahrung. Da es sehr lebhaft Wasser an sich reißt, so empfiehlt es sich, mit zarteren Objekten erst in Mischungen mit Wasser zu gehen, oder, wenn man Alkoholmaterial hat, durch Verdünnungen mit etwa 50 prozentigem Alkohol die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsaustausches herabzusetzen. Das Glyzerin reagiert etwas sauer, greift Kalkspikula an und zerstört Hämatoxylin und Teerfarbstoffe in den Präparaten. Karminfärbungen sind darin dauernd haltbar. Die im Verhältnis zu den Harzen geringe Refraktion des Glyzerins ist zuweilen erwünscht, sie kann durch Verdünnungen mit Wasser weiter heruntergesetzt, durch Zusatz von Chloralhydrat usw. bis auf 1,51 gesteigert werden.

Da Glyzerin flüssig ist (und zudem aus der Luft noch ungefähr ⅓ Volum Feuchtigkeit aufnimmt), so vermag es dem Deckglas auf dem Objektträger nicht genügend Halt zu verleihen. Obwohl also bei diesem Mittel ebenso wie bei

dem hygroskopischen Chlorkalzium und Kaliumazetat ein Eintrocknen nicht zu befürchten ist, so muß doch zum Schutz gegen Verschmieren des Deckglases, Verunreinigung der Einschlußflüssigkeit usw. ein Abschluß der Flüssigkeit von der Luft durch eine Umrandung des Deckglases ausgeführt werden.

Zum Umranden verwendet man am besten zunächst Paraffin oder Wachs, die von Glyzerin auch auf die Dauer nicht verändert werden. Man taucht einen Draht, dessen eines Ende in Deckglaslänge rechtwinklig umgebogen und erhitzt worden ist, in Paraffin und bringt davon zunächst vier kleine Tropfen an die vier Ecken des Deckglases zur ersten Befestigung. Dann legt man das neuerhitzte und in Paraffin getauchte Drahtende auf die Deckglasseiten, wobei genug von dem anhaftenden flüssigen Paraffin abfließt, um einen vorläufigen dünnen Abschluß zu bilden. Man kann auch die kleinen dünnen aufgerollten Wachskerzen zum Einrahmen benutzen, indem man ebenfalls zuerst vier kleine Tröpfchen an die vier Ecken bringt und dann mit dem Rand der eben gelöschten Kerze an der Deckglaskante vorbeifährt. Über den Paraffin- oder Wachsrand wird dann der eigentliche Lackrand gewöhnlich mit einem Pinsel aufgetragen. Man benutzt einen der bei Grübler in Leipzig käuflichen bekanntesten Lacke (Bernsteinlack; Asphaltlack; Maskenlack; Goldgrund [Gold-size] oder stellt sich eine konzentrierteste Lösung von gleichen Teilen Gummi arabikum und Rohrzucker in etwa dem gleichen Volumen 1 % Formollösung (Apathy's Gemisch) oder eine sehr dicke Lösung von venetianischem Terpentin in Alkohol zu dem Zweck her.

Voraussetzung für das Haften eines Kittes, an das bei der Ausdehnung der abgeschlossenen Flüssigkeitsmenge hohe Anforderungen gestellt werden, ist größte Sauberkeit von Deckglas und Objektträger; vor allem soll kein überflüssiges Glyzerin die Stellen schmierig machen (es ist eventl. mit Fließpapier, das in Alkohol angefeuchtet wird, zu

entfernen). Die Deckglaskitte selbst sollen geschmeidig sein, da zu hohe Sprödigkeit ein späteres Abspringen zur Folge haben kann.

Die Unbequemlichkeit der Umrandung, die zudem erst einige Zeit nach Herstellung des Präparates erfolgen soll, hat das Bestreben geweckt Einschlußmittel zu finden, die mehr oder weniger fest werden und so eine stabilere Montierung geben.

Um dem Glyzerineinschluß diesen Vorteil selbst zu verschaffen, versetzt man das Glyzerin mit Gelatine. Diese (oder Hausenblase) wird erst in wenig Wasser etwas aufgequollen, dann geschmolzen und schließlich das gleiche oder 1½fache Volumen Glyzerin, sowie 1 % Karbolsäure zugesetzt. Dann muß durch Glaswolle, feinstes Leinen oder dergleichen heiß filtriert werden. Glyzeringelatine ist halbfest, verflüssigt sich aber bei gelinder Erwärmung. Man benutzt sie in der Weise, daß man ein kleines Stückchen auf den Objektträger bringt, diesen über der Flamme bis zum Schmelzen schwach erhitzt, dann das Objekt hineinbringt und ein leicht angewärmtes Deckglas auflegt. Glyzeringelatine dringt schlechter ein als Glyzerin, bei etwas dickeren Objekten ist daher vorherige Überführung in Glyzerin oder warme Glyzeringelatine anzuraten. Es ist übrigens trotz des halbfesten Aggregatzustandes der Glyzeringelatine späteres Umranden der Präparate anzuraten. Der wesentlichste Nachteil der Mischung besteht darin, daß es schwer ist, die Glyzeringelatine völlig schlierenfrei zu bekommen.

Feste Einschlussmittel.

Neben den Vorzügen einer wirklich festen Montierung, dem Fortfallen der Umrandung, läßt schon die geringe chemische Aktivität fester Stoffe den Einschluß in erhärtende Mittel vorteilhaft erscheinen. Als solche kommen fast nur die Sacharide und besonders die Harze in Frage. Wir gruppieren die Stoffe hier nach ihrem geeignetsten

Lösungsmittel. Vor dem Einschluß müssen die Objekte in diese Lösungsmittel, die daher auch Vormedien (Vorharze) heißen, gebracht werden. Die Vorbehandlung hat sich also nach dem Lösungsmittel zu richten.

1. In Wasser gelöste festwerdende Einschlußmittel.

Hier kommen so gut wie ausschließlich die Sacharide in Betracht. Von diesen ist der Rohrzucker wegen verhältnismäßig niedrigem Brechungsindex, aber starker Neigung zur Kristallisation wenig geeignet. Von den Monosachariden kommt die Laevulose, von Polysachariden das Gummiarabikum in erster Linie in Frage. Beide haben einen recht hohen Brechungsindex (etwa 1,5) und trocknen auf, ohne zu kristallisieren. Letzteres gilt allerdings nicht von reiner Laevulose, die schon nach ein bis zwei Monaten in den Präparaten in Form langer Nadeln zu kristallisieren beginnt. Sonst ist ein unter Erwärmung hergestellter konzentrierter dickflüssiger Sirup (etwas weniger destilliertes Wasser als Laevulose und eine Kleinigkeit Formol oder Karbol) wegen seines relativ leichten Eindringens zu empfehlen. Gummiarabikum ist für sich allein auch nicht zu gebrauchen, weil es viel zu schwer eindringt, es wurde daher mit ungefähr der gleichen Menge von Glyzerin (und Wasser) (Langerhans), oder Chloralhydrat bezw. Kaliumazetat (Hoyer), zu Mischungen benutzt. Apathy bereitet einen Sirup aus gleichen Teilen Gummi, Rohrzucker und Wasser. Auch dieser Sirup dringt jedoch noch zu schlecht ein, so daß man vorher mit dünneren Lösungen durchtränken muß.

Wir empfehlen 1.: einen Sirup von vier Teilen Laevulose, einem Teil Dextrose und vier bis fünf Teilen Wasser mit einem kleinen Formol- oder Karbolzusatz. Die Mischung der beiden Monosacharide kristallisiert nicht. Sie dringt gut ein, so daß man ohne weiteres aus Wasser in dieselbe überführen kann.

2.: Eine **Gummilaevulose** mit zwei Teilen Laevulose, einem oder zwei Teilen Gummiarabikum und vier Teilen Wasser mit etwas Formol oder Karbol. Dieses Gemisch wird schneller fest, dringt aber langsamer ein als das erstgenannte.

Luftblasen sind in den Sirupen zu vermeiden, da sie nicht wie in Harzen allmählich verschwinden.

2. In Alkohol gelöste Einschlußmittel.

Es gibt mehrere Balsame und Harze, die sich in Alkohol, zumal bei Erwärmung, lösen, doch haben sich die meisten alkoholischen Harzlösungen nicht bewährt. Am meisten zu empfehlen ist der

Venetianische Terpentin, der in dem gleichen Volumen 96 %igen Alkohols gelöst und an einem warmen Orte bis zu etwas zäherer Konsistenz eingedunstet wird. Man kann also aus 96 %igem Alkohol oder gar aus 80 %igem das Objekt direkt einschließen, ohne völlige Entwässerung. Das ist bei Herstellung vieler Präparate und besonders in feuchter Luft am Meer usw. sehr bequem und für die Verhinderung von Schrumpfungen vorteilhaft. Der Brechungsindex beträgt 1,473, ist also noch höher als der des Glyzerins. Der Terpentin wird erst nach Monaten ganz fest, doch wird der Rand sehr bald fest genug, um das Deckglas zu halten. Hämatoxylin und die meisten Teerfarbstoffe verbleichen im Terpentin (der Sauerstoff abgibt); dagegen halten sich die Karminfärbungen dauernd, auch für osmiertes Material ist das Einschlußmittel sehr gut.

Alkoholölbalsam. Die Zusammensetzung des venetianischen Terpentins zeigt den Weg, auf dem die Herstellung eines brauchbaren Alkoholbalsams erreicht werden kann. Fein gepulverter Kanadabalsam löst sich in etwa demselben Volumen Alkohol abs. bei längerem Stehen im Thermostaten bei 40—50°. Dieser Alkoholbalsam trocknet aber sehr rasch

und neigt zu blättriger Brüchigkeit, Ausscheidungen etc. und ist deshalb allgemein aufgegeben worden. Im venetianischen Terpentin werden die unangenehmen Eigenschaften des darin enthaltenen festen Harzes, des Kolophoniums, durch die Gegenwart des Terpentinöls hintangehalten, das aber seinerseits schlechte Seiten besitzt. Es erhellt daraus, daß man zu den Alkoholbalsamlösungen 10—20 % eines aetherischen Öls zusetzen muß, und zwar wählt man dabei zweckentsprechend nicht das Terpentinöl, sondern die indifferenten Terpineol, Cedernholzöl, salizylsaures Methyl oder benzoesaures Benzyl je nach dem gewünschten Brechungsindex, der bei den genannten Flüssigkeiten der Reihe nach 1,481; 1,51; 1,53; 1,59 beträgt.

Auch Sandarak ist in alkoholischer Lösung empfohlen worden, ergibt aber keinen zuverlässigen Dauereinschluß. Gilson empfiehlt ein Euparal genanntes Gemisch von Paraldehyd, Eucalyptol und Sandarak mit dem Brechungsindex 1,483, das fast alle Färbungen schonen soll und in das man schon aus 70 %igem Alkohol oder durch ein Gemisch von Paraldehyd und Eucalyptol überführen kann.

Cedernholzöl. Cedernholzöl, Gaultheriaöl (Methylsalicylat) sind recht geeignete flüssige Einschlußmittel, in die man die Objekte aus absolutem Alkohol überführen kann. Von diesen hat das Cedernöl den Vorzug, daß es etwas mehr Wasser löst und zudem mit der Zeit fest wird. Das eingedickte, zu Immersionen benutzte Cedernholzöl ist deshalb eins der allerbesten Einschlußmittel, das Färbungen kaum beeinflußt, sehr hell ist und den geeigneten Brechungsindex 1,52 aufweist, der dem des Glases sehr nahe kommt. Man kann die Objekte aus absolutem Alkohol oder aus dünnem Cedernholzöl einlegen, das nebenbei bemerkt auch für die Beobachtung eines noch nicht eingeschlossenen Objektes, das noch gerollt und von verschiedenen Seiten betrachtet werden soll, sehr zu empfehlen ist.

3. In Vorharzen gelöste Einschlußmittel.

Die als Einschlußmittel gebrauchten Harze enthalten vielfach neben dem festen Harz noch erhebliche Mengen ätherischer Öle, der natürliche Kanadabalsam zum Beispiel 20 bis 25 %. Diese Beimengungen sind im allgemeinen nicht von Nachteil, denn die reinen Harze zeigen beim schnellen Auftrocknen aus Lösungen stark flüchtiger Lösungsmittel wie Chloroform und Benzol und besonders Alkohol Neigung zur Ausscheidung von Kristallen oder amorphen Massen. Nur der relativ sehr weiche venetianische Terpentin verträgt alkoholische Lösung ohne weiteren Zusatz. Man soll daher feste Harze, wie Kolophonium, festen Kanadabalsam, Dammarharz, Sandarak, nicht in Chloroform oder Benzol lösen, sondern in dem weniger flüchtigen Xylol. Noch viel langsamer wird die Lösung in Terpentin fest, die aber wegen ihrer verderblichen Eigenschaften gegenüber Hämatoxylin und Teerfarbstoffen nicht anzuraten ist. Dagegen empfehlen wir bei der Lösung von festen Harzen, zumal wenn Chloroform oder Benzol aus irgendeinem Grunde als Solvens dienen soll, einen Zusatz von Cedernholzöl, Terpineol oder Methylsalizylat.

Die für mikroskopische Zwecke gebräuchlichsten Harze sind: Dammarharz mit dem Brechungsindex 1,52, Kanadabalsam mit 1,535 (in Lösung weniger), Gum Thus, Kolophonium, der dunkle Styrax mit 1,63, der sehr helle Liquidambar und der Tolubalsam mit 1,64. Die Verschiedenheit der Brechungsindices kann im einen oder anderen Sinne ausgenutzt werden. Weitaus am meisten gebraucht wird der Kanadabalsam in dickflüssiger Lösung.

Die Objekte, die in einen der genannten Harze eingeschlossen werden sollen, müssen vorher von dem Lösungsmittel durchtränkt werden. Da diese Lösungsmittel der Harze aber kein oder nur Spuren von Wasser lösen, so müssen die Objekte vor der Überführung in das Vorharz in absolutem Alkohol gründlich entwässert werden, was bei kleinen

Objekten eine halbe Stunde dauern kann, bei auf Objektträgern aufgeklebten Schnitten jedoch in 5—10 Minuten erreicht zu sein pflegt. Jeder Schnitt und jedes Objekt muß also, wenn es vorher, etwa zum Färben, im Wasser war, erst in 50 %igen, dann in 70 %igen, weiter in 96 %igen und dann zur definitiven Entwässerung in absoluten Alkohol und schließlich in das Vormedium, das gewöhnlich sehr schnell eindringt und bei besonders zarten Objekten erst noch in der Mischung 1 : 1 mit absolutem Alkohol vorgeschaltet werden kann. Lose Objekte überträgt man mit einem Spatel aus einem Salznäpfchen in ein entsprechendes Gefäß mit der folgenden Flüssigkeit, um es schließlich auf einen Objektträger zu bringen, einen Tropfen Einschlußmittel und endlich das Deckglas aufzulegen. Sollen mehrere Objekte unter ein Deckglas, so müssen sie vorher auf dem Objektträger richtig geordnet werden, und wenn Verschiebungen beim Deckglasauflegen zu befürchten sind, vorher mit ganz eingedicktem Harz festgeklebt werden. Die auf Objektträger aufgeklebten Schnitte werden gewöhnlich zum Entwässern usw. in verschließbare Zylindergläser von etwa 10 cm Höhe und 4—5 cm Durchmesser gebracht, von denen das eine Alkohol von 70 %, das folgende 96 %igen Alkohol, das nächste absoluten und das letzte Xylol enthält. Man kann auch aus Chloroform, das nicht so stürmisch eindringt, in Xylolbalsam gehen. Die Langwierigkeit der Vorbehandlung und die Unumgänglichkeit starker Diffusionsströmungen, die bei zarten Objekten zur Schrumpfung führen können, sind natürlich die Schattenseiten des sonst beinahe idealen Einschlusses in festwerdende Harze.

A n h a n g. Die Betrachtung der Beugungserscheinungen bei der mikroskopischen Bilderzeugung lehrt, daß die Auflösungsfähigkeit des Mikroskopes für feine Strukturen proportional dem Brechungsindex des Einschlußmittels wächst. Diese Strukturen müssen dann allerdings durch Färbung gut

differenziert sein, da die ungefärbten Strukturen in den starkbrechenden Medien noch mehr aufgehellt werden und durch Fortfall der oben erwähnten Refraktionsanteile am Bild fast verschwinden. Schon Styrax, Liquidambar und besonders der Tolubalsam haben hohe Brechungsexponenten. Noch höher kommt man mit Monobromnaphthalin ($n = 1{,}661$), Kaliumquecksilberjodid ($n = 1{,}712$) (bestehend aus 65 g Quecksilberjodid und 50 g Jodkalium auf 25 g Wasser), Schwefel in Schwefelkohlenstoff gelöst ($n = 1{,}75$), Phosphor in Schwefelkohlenstoff ($n = 1{,}95$) und endlich Bromschwefelarsen ($n = 2{,}4$). Diese Lösungen haben zum Teil auch bei der Auflösung feinster Strukturen des Diatomeenkörpers eine Rolle gespielt, sind aber zum allgemeinen Gebrauch ungeeignet.

Allgemeines über das Färben.

Das verschiedene Lichtbrechungsvermögen der fixierten Gewebe läßt nur in geringem Maße deren feinere Struktur erkennen. Um diese deutlicher hervortreten zu lassen, werden die Objekte in der Weise gefärbt, daß die verschiedenen Gewebe, oder falls es sich um cytologische Untersuchungen handelt, die verschiedenen Bestandteile der Zellen sich durch den Grad der Farbstoffaufnahme voneinander unterscheiden. Dies setzt ein ungleiches Verhalten der verschiedenen Eiweißkörper gegenüber dem Farbstoff voraus. Die Möglichkeit, durch Färben mit zwei oder mehreren Farbstoffen die Kontraste zu erhöhen, zeigt ferner, daß derselbe Eiweißkörper auf den einen Farbstoff reagiert, auf einen anderen dagegen nicht. Nicht in allen Fällen dürfen wir jedoch darin eine Reaktion sehen, die dem betreffenden abgetöteten Eiweißkörper an sich inhärent ist. Meist ist dieser durch die Einwirkung der Fixationsflüssigkeiten in seinem Verhalten gegenüber den Farbstoffen wesentlich verändert.

Die Erfahrung hat gelehrt, daß das Fixieren der Gewebe mit Alkohol die natürliche „Färbbarkeit“ sehr gut erhält.

Auch die Sublimatgemische sind in dieser Hinsicht sehr zu empfehlen, während andererseits die Osmiumgemische die Färbbarkeit ganz erheblich herabsetzen. Pikrinsäure und Chromsäure verändern manche Färbungen in ganz bestimmter Weise. Doch kann der Einfluß dieser Säuren durch sorgfältiges Auswaschen stark abgeschwächt werden, sofern nicht ihre Wirkung als Beize erwünscht ist (s. später).

Wenn auch die verschiedenen Gewebe und deren einzelne Teile sich den Farbstoffen gegenüber verschieden verhalten, so ist doch die Regel, daß diese Differenzen nur gradueller Natur sind. Es muß daher darauf geachtet werden, daß dasjenige Maß von Farbenaufnahme erreicht wird, bei welchem die Kontraste für die Untersuchung die geeignetste Intensität besitzen. Dies kann auf drei verschiedene Weisen erzielt werden.

Man kann das Objekt einer Farblösung aussetzen, die einen solchen Grad der Verdünnung hat, daß nur einige Gewebsbestandteile den Farbstoff anzureichern vermögen, wie lange man auch färben mag. Praktisch kommt jedoch dieses sogenannte e l e k t i v e Verfahren kaum in Betracht. Man färbt entweder p r o g r e s s i v, indem man dem Objekt eine etwas konzentriertere Lösung bietet und nun den Prozeß kontrolliert, um ihn im geeigneten Moment zu unterbrechen. Wir erzielen auch dann noch eine Färbung entsprechend den spezifischen Affinitäten der Gewebsbestandteile.

Diesen Vorteil geben wir auf, wenn wir r e g r e s s i v färben. Dabei wird zunächst überfärbt und dann durch ein passendes Extraktions- oder Differenzierungsmittel die Farbe zum Teil wieder ausgezogen. Mit dieser Methode erzielt man häufig sehr gute Konstraste in Fällen, wo eine progressive Färbung versagen würde. Denn meist sind die Differenzen, die die verschiedenen Strukturteile hinsichtlich dem Festhalten der Farbstoffe zeigen, sehr viel größer als die, die sie in der Geschwindigkeit der Aufnahme derselben aus konzentrierten Lösungen äußern.

Da dem Differenzierungsmittel notwendig alle Gewebspartien in gleicher Weise ausgesetzt sein müssen, so eignen sich regressive Färbungen am besten für Schnitte, die zudem gleichmäßig dick sein müssen, wenn eine einheitliche Färbung entstehen soll

Theorien der Färbung.

Bei dem Versuch, zu erklären, welcher Art die Kräfte seien, die die Gewebsteile befähigen, in verschiedener Weise Farbstoffe aufzunehmen und festzuhalten, ist man bei den verschiedensten Theorien auf Schwierigkeiten gestoßen. Am wenigsten glücklich scheint der Versuch zu sein, nur physikalische Kräfte hierfür in Anspruch nehmen zu wollen. Aber auch eine rein chemische Erklärung vermag nicht den Tatsachen gerecht zu werden. Am aussichtsreichsten sind wohl die Theorie von Witt und die von Heidenhain.

Witt sieht in dem Vorgang der Färbung einen chemischen Prozeß; jedoch ist für dessen Ablauf nicht das Molekulargewicht bestimmend. Vielmehr wird angenommen, daß der Farbstoff in der Form einer starren Lösung in der kolloidalen Substanz zurückgehalten wird, ebenso wie bei den gefärbten Gläsern. Bei der Färbung wandern durch dialytische Wirkung zunächst Farbstoffmoleküle in das Innere des Objekts solange, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. Ist die Löslichkeit des Farbstoffs im Wasser und in den Eiweißkörpern die gleiche, so wird es möglich sein, durch reines Wasser den Farbstoff wieder vollständig aus dem Objekt auszuwaschen. Da dies aber meist nicht der Fall ist, so muß man annehmen, daß die Löslichkeit in den Eiweißkörpern im allgemeinen höher ist als im Wasser und im Alkohol.

Heidenhain geht davon aus, daß die koagulierten Eiweißkörper noch in derselben Weise auf Basen und Säuren reagieren wie im nicht koagulierten Zustande. Sie gehen also

auch in derselben Weise mit sauren oder basischen Farbstoffen chemische Verbindungen ein. Doch reagieren nicht alle Eiweißmoleküle so, sondern vorzugsweise nur die, die in Lösung gehalten werden. Daß stets ein geringer Teil in Lösung geht, das lehrt nach Heidenhain schon die Möglichkeit, Schnitte mit reinem Wasser aufzukleben, wobei das gelöste Eiweiß als Kitt dient. Da die Eiweißstoffe als Kolloide nicht diffundieren, so werden sie von dem Farbstoff noch an Ort und Stelle angetroffen und als gefärbte Moleküle ausgefällt.

Substantive und adjektive Farbstoffe.

Beizen.

Die meisten Farbstoffe, die in der histologischen Technik Verwendung finden, besitzen den abgetöteten Geweben gegenüber eine Färbekraft, die vollständig ausreicht, um sie ohne besondere Vorbehandlung der Objekte in Anwendung bringen zu können. In der technischen Färberei spricht man in diesem Falle von substantiven Farbstoffen. Diesen werden die adjektiven gegenübergestellt, deren Affinität zu dem zu behandelnden Körper nicht ausreicht, um eine genügende Färbung zu erzielen. Hier muß eine bestimmt gerichtete Vorbehandlung der Gewebe stattfinden, es muß eine Vermittlerin gefunden werden, die einerseits mit dem Gewebe, andrerseits auch mit dem Farbstoff reagiert. Hierfür kommen hauptsächlich Metallsalze und Metallhydrate in Betracht. Man nennt diese Mittel Beizen.

Da eine große Anzahl der gebräuchlichen Fixierungsmittel Metallsalze enthalten, so werden die Gewebe beim Fixieren häufig gleich gebeizt. Doch nicht, oder wenigstens meistens nicht für alle Farben. Denn im allgemeinen gilt, daß saure Farben basische Beizen fordern und umgekehrt. So können auch saure Anilinfarben als Beize wirken für eine nachfolgende basische Farbe. In derselben Weise kann bei umgekehrter Reihenfolge der basische Farbstoff für

den nachfolgenden sauren die Rolle einer Beize übernehmen.

Bei gebeizten Objekten findet häufig zunächst eine etwas diffuse Färbung statt, so daß eine nachträgliche Entfernung eines Teils des Farbstoffs nötig wird. Es muß also differenziert werden; der Färbungsmodus nach dem Beizen ist also ein regressiver.

Als Differenzierungsmittel kommen in Betracht: für Hämatoxylin, das ungebeizte Gewebe überhaupt nicht färbt, Alaun und Eisenalaun, dann aber schwache Säuren, Basen, Reduktions- und Oxydationsmittel. Anilinfarben differenziert man mit Alkohol, dem man eventl. etwas Säure zugefügt hat. Doch kann man auch an Stelle des angesäuerten Alkohols eine saure Anilinfarbe (besonders Orange G.) setzen.

Saure und basische Teerfarbstoffe.

Nach Ehrlich kann man die Teerfarben in saure und basische einteilen, je nachdem das färbende Prinzip durch eine Säure oder eine Base gegeben ist. Durch Mischung von beiden entstehen neutrale Farben. Im allgemeinen sind die basischen Farben Kernfarbstoffe, die sauren Plasmafarbstoffe. Doch ist damit nicht gesagt, daß man mit diesen nicht auch das Chromatin der Kerne, und mit jenen das Plasma färben kann. Besonders läßt die regressive Färbemethode, bei der es weniger auf schnelle Aufnahme der Farbe als auf intensives Festhalten derselben ankommt, auch mit Plasmafarben starke Kernfärbung erzielen.

Läßt man einen Plasmafarbstoff und einen Kernfarbstoff einwirken, und zwar nacheinander oder zu gleicher Zeit, so erhält man eine Mehrfachfärbung. Hierbei läßt man meist den Kernfarbstoff vorangehen; die saure Plasmafarbe kann dann als Differenzierungsmittel für jenen verwendet werden (s. regressive Färbung).

Intravitale Färbung.

Unter Färbung intra vitam versteht man eine Färbung von Geweben des lebenden Tieres, die von diesem ohne jeden Schaden ertragen wird. Denn es zeigt sich, daß die Farbe ganz andere Teile der Zelle in Angriff nimmt, je nachdem die Gewebe lebensfrisch, oder aber durch irgendwelche Schädigungen abgetötet oder dem Absterben nahe gebracht worden sind. Im ersten Falle tritt bei Metazoen nie eine Kernfärbung ein, so daß das Ausbleiben derselben direkt ein Indizium für die Lebensfrische der Zellen abgibt. Tritt aber das für die toten Gewebe charakteristische Färbungsbild auf, so verliert die vitale Färbung vollständig ihre Bedeutung. Denn diese liegt ja eben zum Teil darin, festzustellen, welche Zellelemente in der lebenden Zelle sich den Farbstoffen gegenüber aktiv verhalten. Derartige Untersuchungen haben im allgemeinen das Resultat ergeben, daß zunächst die an sich leblosen Stoffwechselprodukte der Zellen gefärbt werden, wie Dotterelemente, Abbauprodukte, ferner Pigmentkörnchen, Flüssigkeitsvakuolen usw. Von besonderer Bedeutung ist es aber, daß auch bestimmte Granula in hohem Maße Farbe aufnehmen, die einen integrierenden Bestandteil der Zelle darzustellen scheinen. Sie sind in jeder Zelle vorhanden und zeigen oft eine für die betreffende Zellart typische Form und Anordnung. Man darf daher wohl annehmen, daß sie lebende Elementarteile der Zelle darstellen.

Bei der Wahl der Farbstoffe können natürlich nur solche in Betracht kommen, die in geringer Konzentration keinerlei Schädigung der Gewebe zur Folge haben, und die andererseits auch befähigt sind, mit den Eiweißkörpern der lebenden Zelle in Reaktion zu treten. Farbstoffe, die diese Bedingungen erfüllen, sind: Methylenblau, Bismarckbraun, Neutralrot, Nilblau, ferner für Protozoen Cyanin und wässrige Hämatoxylinlösung, für Rotatorien Kongorot, und für Amphibien Janusgrün. Dies sind, wie die Erfahrung gelehrt hat, die brauchbarsten Farbstoffe, doch können auch

andere wie Dahlia, Gentianaviolett, Eosin usw. Verwendung finden.

Die Farbstoffe können in gelöstem oder in ungelöstem Zustande in den Tierkörper eingeführt werden, und zwar entweder per os oder per anum, oder sie werden in die Körperhöhlen, in die Lymphbahnen usw. injiziert. Bei kleineren Objekten verfährt man häufig am besten so, daß man die Tiere in eine verdünnte Farblösung setzt. Es zeigt sich hierbei, daß auch bei überaus geringer Konzentration die Farbe allmählich aus der Lösung ausgezogen und in dem Tierkörper aufgespeichert wird. Die Bilder, die man auf diese Weise erhält, sind viel distinkter als bei Anwendung einer konzentrierteren Lösung.

Allgemeine Regeln über die beste Konzentration der Lösungen lassen sich nicht aufstellen. Soll die Aufnahme durch die Körperoberfläche erfolgen, so genügen sehr viel verdünntere Lösungen (1:100 000 bis 1:1000 000), als bei Injektionen.

Ein Fixieren der intravitalen Färbung ist bis jetzt nicht gelungen. Der Effekt kommt immer mehr oder weniger dem einer direkten Färbung der abgetöteten Gewebe gleich.

Da nur basische Anilinfarben und zwar in unzersetzter Form von der lebenden Zelle aufgenommen werden, und da es auch diese Farben sind, die in Cholesterin und in Lecithin löslich sind, so ist anzunehmen, daß die Auswahl der Farben von seiten der lebenden Zelle durch die Imprägnation der Plasmahaut mit diesen Stoffen bedingt ist. Die basischen Anilinfarben, die sie in Lösung zu halten vermögen, lassen sie in die Zelle eintreten, während die in ihnen meist unlöslichen Sulfosäurefarbstoffe zurückgehalten werden.

Spezielle Färbemethoden.

Färben mit Karminen.

Die Gemische, die mit Karmin, Karminsäure oder Cochenille hergestellt sind, eignen sich besonders für Stückfärbung und für Färbung ganzer Tiere. Dem Anfänger sind

Alaunkarmin, Karmalaun und Boraxkarmin besonders zu empfehlen, da die Technik hier sehr einfach ist. Überfärbung findet kaum statt oder kann durch Alaunlösung bezw. schwach sauren Alkohol wieder rückgängig gemacht werden. Für Schnittfärbung leistet Parakarmin oft sehr gute Dienste, besonders wenn die Schnitte nicht in niederen Alkohol oder Wasser gebracht werden dürfen. Auch bei dotterreichen Embryonen bietet es Vorteile, da der Dotter kaum mit gefärbt wird.

Karmin ist eine Verbindung von Karminsäure mit Tonerde, Kalk und Eiweißkörpern; die ähnlich färbende Cochenille enthält ein karminsaures Alkali (P. Mayer), das im alkoholischen Auszug allein für die Färbung in Betracht kommt. Der wässrige Auszug mit Alaun färbt dagegen viel kräftiger durch das in ihm enthaltene Aluminiumkarminat.

Alaunkarmin. 1—5%iger Ammoniakalaun wird 10 bis 20 Minuten mit ½—1% Karmin gekocht und nach Erkalten filtriert. Reaktion alkalisch. Für Totalpräparate (Plankton) sehr geeignet, doch darf es sich nur um kleine Tiere handeln, da Alaunkarmin schlecht durchfärbt. Reine Kernfärbung erreicht man durch Auswaschen mit Alaun (oder mit schwacher Säure in 70—80%igem Alkohol).

Karmalaun. 1 g Karminsäure und 10 g Alaun in 200 ccm warmem oder kaltem Wasser gelöst, filtriert und Antiseptikum (Formol 1 ccm oder Salizylsäure $^1/_5$ g) hinzugefügt. Reaktion sauer. Verwendung wie Alaunkarmin, ist jedoch auch zu Stückfärbung geeignet; doch muß hier besonderes darauf geachtet werden, daß die Objekte nicht alkalisch reagieren.

Alauncochenille. Fein zerriebene Cochenille in 5%iger Alaunlösung längere Zeit gekocht, filtriert und Antiseptikum (etwas Salizylsäure) hinzu. Verwendung wie Karmalaun. Reaktion sauer.

Eisenkarmalaun. Zu 200 ccm Karmalaun 0,1 g Eisenoxydulammonsulfat, filtriert, 2 Tropfen Salzsäure und als

Antiseptikum etwas Thymol hinzu. Für Stückfärbung geeignet. Für Schnitte setzt man 20 ccm dieser Mischung zu 80 ccm einer 5%igen Alaunlösung und fügt noch etwas Salzsäure (1 Tropfen) und Thymol zu. Beide Gemische reagieren sauer und geben reine Kernfärbung.

Pikrokarmin. Eines der ältesten Mittel für Doppelfärbung, bei der die Kerne rot, das Plasma, insbesondere verhornte Epidermis u. a. gelb werden. Es wird verschieden hergestellt, in den Gemischen finden bezw. bilden sich immer Ammoniumpikrat, Ammoniakkarmin und freies Ammoniak (Mayer). Pikrokarmin nach Weigert kann bei Grübler in Leipzig fertig bezogen werden. Jetzt ist es meist üblich, erst in einem Karmingemisch und nachträglich in Pikrinsäure in Wasser, Alkohol oder Xylol zu färben. Pikrokarmin eignet sich auch zur Nachfärbung, wenn mit einem starken Kernfarbstoff, z. B. Hämatoxylin, vorgefärbt wurde.

Magnesiakarmin. Das Karmin wird hier in einer Lösung gebrannter Magnesia gelöst, die die Gewebe weniger angreift, als das sonst verwandte Ammoniak. Auch ist diese Lösung haltbarer. Starkes Magnesiakarmin: 1 g Karmin und 0,1 g Magnesia usta mit 50 ccm dest. Wasser 5 Minuten gekocht, filtriert und etwas Formol hinzu. Nicht alles Karmin wird beim Kochen gelöst. Schwaches Magnesiakarmin: 0,1 g Karmin in 50 ccm Magnesiawasser ½ Stunde gekocht, filtriert und Formol hinzu. Die beiden Lösungen färben annähernd gleich; sind für Schnitt- und Totalpräparate brauchbar. Gut auswaschen in Wasser.

Das Magnesiakarmin wird auch mit Zusatz von Magnesiumpikrat verwendet. 1 Teil stark. Magnesiakarmin zu 10 Teilen Magnesiumpikratlösung oder 1 Teil schwaches Magnesiumkarmin zu 1 Teil Magnesiumpikratlösung. Das Magnesiumpikrat kann bei Grübler bezogen werden; man hat 0,6 g des Salzes in 100 ccm dest. Wasser zu lösen. Oder man stellt es sich selbst her, indem man 0,25 g Magnesiumkarbonat in 200 ccm einer ½%igen wässrigen Pikrin-

säurelösung kochen und dann sich absetzen läßt und schließlich filtriert.

Kaliumkarmin: Karmin 3 g, Kalium carbonic. 1 g und Chlorkalium (KCl) 5 g sind in 60 ccm dest. Wasser einige Minuten in größerem Gefäß, da stark schäumt, zu kochen. Nach dem Erkalten werden 20 ccm Liq. ammon. caust. zugesetzt. Die Lösung ist sofort gebrauchsfertig und hält sich in gut verschlossener Flasche einige Zeit. Für Glykogenfärbung ist sie im Sommer etwa 3 Wochen, im Winter länger brauchbar. Die Färbfähigkeit für Kerne nimmt mit der Zeit zu.

Kaliumkarmin ist besonders für Glykogenfärbung auf Schnittpräparaten geeignet (Best.). Man verfährt wie folgt: Einbetten in Zelloidin, da Glykogen in Wasser löslich ist, jedoch diese Löslichkeit verliert, wenn es in Zelloidin eingeschlossen ist. Vorfärben in Zelloidin mit Hämatoxylin nach Böhmer oder Böhmer-Hansen. Dann kommen die Schnitte in ein (nur kurze Zeit haltbares) Gemisch, das sich zusammensetzt aus der oben angegebenen

Kaliumkarminlösung	2	Teile
Liq. ammon. caustic	3	,,
Methylalkohol	3	,,

Nach 5 Minuten wird differenziert in einem Gemisch von

Alkohol abs.	80	Teile
Methylalkohol	40	,,
Aq. dest.	100	,,

Nach einigen Minuten bleibt die zu wechselnde Differenzierungsflüssigkeit klar. Dann bringt man die Schnitte in 80%igen Alkohol, abs. Alkohol usw. Das Kaliumkarmin färbt nur Glykogen, derbes Bindegewebe, ferner Sekretionszellen, Mucin, Körnelungen der Mastzellen, die Corpora amylacea im Nervensystem, die noch nicht der Verkalkung nahe stehen und osteoides Gewebe kurz vor der Verkalkung.

Lithiumkarmin. Durch Zusatz von Salzen wird die Färbekraft von Lithiumkarmin wesentlich gesteigert. Best

empfiehlt: Karmin 2 g, Ammon. chlorat 4 g, Lithium carbon. 1 g, in 100 ccm Aq. dest. zu kochen. Nach dem Erkalten sind 20 ccm Liquor ammonii caustici hinzuzusetzen. Die Färbekraft nimmt mit dem Alter zu. Gegen Schimmeln kann etwas Thymol zugesetzt werden. Die Schnitte kommen direkt in Alkohol, der 1—10% Salzsäure enthält (nicht in Wasser, da hier das Karmin sofort diffundiert).

Boraxkarmin. In einer 4%igen wässrigen Boraxlösung wird 2—3% Karmin durch Kochen gelöst, dann das gleiche Volumen 70%iger Alkohol hinzugefügt. Nach einiger Zeit filtrieren. Die alkoholische Boraxkarminlösung ist ein beliebtes Mittel zum Duchfärben. Bei größeren Objekten kann es Tage beanspruchen, bis sie gut durchgefärbt sind. Dann kommen sie direkt in Alkohol 70%, der mit einigen Tropfen Salzsäure (1%) angesäuert ist. In Wasser würde die Farbe wieder herausziehen, in hochprozentigem Alkohol dagegen ausfallen; in Säurealkohol aber bleibt sie in Lösung und wird in den Kernen fest gebunden, während sie aus den verschiedenen plasmatischen Teilen verschieden stark auszieht.

Das wässrige Boraxkarmin wird nicht mehr verwendet, da es die Gewebe zu sehr maceriert. Man tut daher gut, dem Boraxkarmin, wie es von Grübler in Tabletten geliefert wird, und das nach der Vorschrift nur in Wasser gelöst werden soll, nach dem Kochen noch gleichen Teil 70%igen Alkohol zuzufügen. In der alkoholischen Lösung maceriert zwar das Boraxkarmin selbst weniger, wohl aber kann hier der etwa 35%ige Alkohol ähnlich wirken. Dies ist bei großen Objekten, die Tage brauchen, um sich gut durchzufärben, wohl zu beachten. Für diese eignet sich mehr das:

Parakarmin: Man löst 1 g Karminsäure, ½ g Chlornatrium und 4 g Chlorkalcium in 100 ccm 70%igem Alkohol, läßt absetzen und filtriert. Zum Durchfärben namentlich großer Objekte recht geeignet, da es schneller eindringt als Boraxkarmin. Hält sich sehr lang, auch fällt hier die macerierende Wirkung des niederen Alkohols weg, da in 70%igem

Alkohol gelöst wird. Doch dürfen die Objekte nicht alkalisch reagieren und nicht viel Kalk enthalten, da sonst Niederschläge entstehen. Handelt es sich um Totalpräparate, so wird dem 70%igen Alkohol, in dem ausgewaschen wird, etwas Chloraluminium oder 2½% Eisessig zugesetzt, um die Farbe aus dem Plasma auszuziehen. Für große Objekte kann das Parakarmin auch zweckmäßig mit 70%igem Alkohol stark verdünnt angewandt werden; doch tut man gut, in diesem Falle etwas anzusäuern, um Niederschläge zu vermeiden.

Cochenilletinktur: 1 Teil pulverisierte Cochenille kommt in 10 Teile 70%igen Alkohol, wird öfter umgeschüttelt und nach einigen Tagen abfiltriert. Die Objekte werden aus 70%igem Alkohol in die Farbe gebracht. Auswaschen ebenfalls in Alkohol 70%; bei Überfärben Zusatz von etwas Salz- oder Essigsäure. Dauer der Färbung Minuten bis Tage. Das Plasma wird kaum gefärbt. Ausschlaggebend für den Charakter der Färbung ist die Anwesenheit und auch die Abwesenheit von Salzen. Daher hat die Art der Fixierung einen wesentlichen Einfluß. Am besten gelingt die Färbung nach Fixieren (das Fixationsmittel wirkt als Beize) mit Pikrinsäure oder Chromsäuregemischen. Auch Alkoholmaterial ist geeignet. Hat hauptsächlich für Plankton Bedeutung.

Eine neue Cochenilletinktur (nach Mayer) bringt die für die Färbung günstigen Salze gleich mit. Sie besteht aus 5 g Cochenille, 5 g Chlorkalzium, ½ g Chloraluminium, 8 Tropfen Salpetersäure (von 1,20 spez. Gew.) und 100 ccm 50%igem Alkohol. Die Objekte kommen aus 50%igem Alkohol in dieses Gemisch.

Chromalauncochenille (nach Hansen). Chromalaun 5 g, dest. Wasser 200 g, Cochenille 10 g werden 15—20 Minuten gekocht und dann filtriert. Die Kerne werden kräftig graublau gefärbt, das Plasma weniger stark grau. Die Lösung eignet sich gut zum Durchfärben.

Färben mit Hämatoxylin-(Hämateïn)-Gemischen.

Das Hämatoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$, genaue Konstitution unbekannt) wird aus dem Blauholz (Blut- oder Campecheholz), dem Kernholz der mittelamerikanischen Leguminose „Hämatoxylon campechianum" durch Ausziehen mit wasserhaltigem Äther gewonnen. Die Kristalle von Hämatoxylin sind farblos, werden aber in der Regel außen durch Oxydation etwas gebräunt; sie lösen sich langsam in Wasser, Alkohol und Glyzerin. Die Lösungen oxydieren sich schon an der Luft und gehen innerhalb mehrerer Wochen in Hämateïn ($C_{16}H_{12}O_6$) und noch höhere Oxydationsstufen über. Hämatoxylin reagiert wie eine schwache Säure und bildet Salze.

Hämatoxylin selbst ist zum Färben ungeeignet. Es muß erst durch mehrwöchentliches Stehen an der Luft zu Hämateïn oxydieren („reifen"), ein Prozeß, der durch häufiges Umschütteln und noch mehr durch Zusatz von Oxydationsmitteln (Wasserstoffsuperoxyd u. a.) beschleunigt wird. Die reife Lösung ist jedoch nicht dauernd haltbar, sondern geht allmählich in nicht färbende höhere Oxydationsstufen über. Eine „reife" Lösung enthält stets unreife, reife und überreife Bestandteile in nicht zu berechnenden Mengen. Das Hämateïn vermag jedoch allein auch nur eine diffuse Bräunung in den Geweben zu erzeugen. Man gibt daher dem wie eine Säure reagierenden Farbstoff Gelegenheit ein Salz (Farblack) zu bilden dadurch, daß man ihm in den Geweben eine Base darbietet. Diese ist in seltenen Fällen in geeigneter Menge bereits in dem Gewebe vorhanden. Wenn nicht, so wird sie erst in die Gewebe hineingebracht, d. h. die Gewebe werden gebeizt (siehe p. 113) oder aber sie wird zugleich mit dem Farbstoff dem Gewebe dargeboten. Diese Beize kann auch zugleich dazu dienen, das Hämatoxylin zu Hämateïn und höheren Hämateïnverbindungen zu oxydieren.

Im allgemeinen verwendet man zur Beizung Alaun oder ein anderes Tonerdesalz. Wird erst gebeizt und dann

gefärbt, so gebraucht man meist Eisen- oder Chromalaun. Mit dem nachher hinzugefügten Hämatoxylin (Hämateïn) entsteht dann ein Salz (Farblack), indem das Hämatoxylin wohl in noch höherer Oxydationsstufe als in Hämateïn enthalten ist. Das Hämateïn soll die blausten Farbtöne liefern. Mit zunehmender Oxydation werden die Töne mehr violett bis schwarz, während eine überreife Lösung nur noch braun zu färben vermag.

Die Färbungen mit Hämatoxylingemischen haben den Vorzug, daß sie auch bei vorausgegangener Chrom- oder Osmiumfixierung distinkte Bilder lieferte. Besonders für Kernstudien sind sie zu einem oft unentbehrlichen Hilfsmittel geworden. Doch läßt sich auch Plasmafärbung damit erzielen.

1) Hämateïn-Tonerde.

Die beiden Bestandteile werden dem Objekt meist in derselben Lösung dargeboten. Die Färbung ist mehr rot oder blau, je nachdem das Gemisch sauer oder neutral reagiert. Die rote Färbung wird in eine blaue übergeführt durch Waschen in Brunnen- oder Leitungswasser, das meist genügend alkalisch reagiert. Wenn nicht, so setzt man etwas Ammoniak, oder schonender etwas Natriumbikarbonat hinzu. Die hierbei eintretende Bläuung beruht nicht einfach auf dem Neutralisieren der Gewebe. Mayer und Fischer haben diesen Vorgang in verschiedener Weise zu erklären versucht.

Schwache Lösungen geben keine so distinkte Färbung wie starke, besonders wenn sie nur mit Wasser verdünnt sind. Verdünnt man dagegen mit angesäuertem Wasser oder mit Alaunlösung, so wird dieser Nachteil etwas aufgehoben. Doch erzielt man eine reine Kernfärbung am besten durch starke Gemische. Diese neigen aber wieder oft zum Überfärben. Dem begegnet man dadurch, daß man das Zuviel hinterher wieder durch Alaunlösung oder ev. auch durch schwach angesäuertes Wasser (einige Tropfen Salzsäure in die üblichen Standgläser für Objektträger) auszieht. Die

Säure muß dann wieder gut ausgewaschen werden, entweder in viel Wasser oder in Alkohol mit ganz wenig Natriumbikarbonat oder Ammoniak, da sonst die Haltbarkeit sehr beeinträchtigt wird. Hat man Alaun benutzt, so muß auch dieser gründlich wieder entfernt werden, da er sonst im Balsam auskristallisiert. Bei Doppelfärbung wird meist erst mit Hämatoxylin gefärbt, dem man dann eine Plasmafarbe folgen läßt.

In Kanadabalsam leidet die Färbung mit der Zeit meist nur wenig, nur am Rande des Deckgläschens geht sie oft in Rot über, um schließlich vollständig auszubleichen. Terpentinöl ist zu vermeiden.

Alaunhämatoxylin nach Böhmer. Zu einem Uhrschälchen voll Alaunlösung (0,4%ig) bringt man einige Tropfen einer reifen Hämatoxylinlösung (1 Teil in 12 Teilen abs. Alkohol). Nachbehandlung siehe: Allgemeines über Hämateïn-Tonerde. Wenig gebraucht, da es erst reifen muß, und durch das sofort gebrauchsfertige Hämatoxylin nach Böhmer-Hansen überholt ist.

Alaunhämatoxylin nach Böhmer-Hansen. Um die Mischung gleich gebrauchsfertig zu machen, wird dem Hämatoxylin ein Oxydationsmittel beigegeben. 20 g Kalialaun werden in 200 ccm warmem dest. Wasser gelöst und darin 1 g Hämatoxylin in Lösung gebracht. Ferner löse man 0,18 g Kaliumpermanganat in einer kleinen Menge Wasser. Beide Lösungen werden kalt vermischt und dann kurze Zeit zum Kochen erhitzt. Dadurch wird die Oxydation und die Lackbildung beschleunigt und das Gemisch sofort gebrauchsfertig. Sehr empfehlenswerte Kernfärbung für Schnitte. Behandlung siehe: Allgemeines über Hämateïn-Tonerde. Kann mit 5%iger Alaunlösung verdünnt werden, zumal für Stückfärbung. Zum Durchfärben größerer Objekte weniger geeignet als die schneller eindringenden Glyzeringemische (s. nebenstehend).

Alaunhämatoxylin nach Mayer. 1 g Hämatoxylin wird in 1 Liter Wasser gelöst und 50 g Alaun zugegeben. Durch Zusatz von 0,2 g Natriumjodat wird die Oxydation des Hämatoxylins beschleunigt. Mayer nennt das Gemisch Hämalaun, weil er früher das schon fertige Oxydationsprodukt (Hämateïn) statt Hämatoxylin verwendete. Doch kehrte er zu der alten Vorschrift zurück, da sich damit präzisere Färbungen erzielen lassen und oxydierte statt wie Hansen mit Kaliumpermanganat mit Natriumjodat. Infolge der oxydierenden Kraft des Natriumjodat ist das Gemisch sofort gebrauchsfertig.

Für Schnitte und zum Durchfärben (mit Alaun verdünnt) geeignet. Dringt jedoch nicht so schnell ein wie das Delafields'sche (größere Objekte müssen Tage darin verweilen). Über Färbung siehe: Allgemeines über Hämateïn Tonerde. Stets muß gut ausgewaschen werden, sei es auch nur, um den Alaun zu entfernen, den sonst im Kanadabalsam auskristallisiert.

Alaunhämatoxylin nach Delafields. Zu 400 ccm einer gesättigten Ammoniakalaunlösung bringt man eine Lösung von 4 g Hämatoxylin in 25 ccm starkem Alkohol. Das Gemisch bleibt einige Tage offen stehen; dann wird filtriert, 100 ccm Glyzerin und 100 ccm Methylalkohol hinzugefügt und wieder filtriert. Hierauf bleibt es offen stehen, bis es dunkel geworden ist (etwa 2 Monate). Vor Gebrauch ist es mit Wasser zu verdünnen. Von Grübler kann die fertige Lösung bezogen werden. Über Färbung gilt das unter Hämateïn-Thonerde Gesagte. Das Delafields'sche Alaunhämatoxylin hat den Nachteil, daß es erst nach Monaten gebrauchsfertig ist, und daß es wieder schnell verdirbt. Doch macht es sein Gehalt an Glyzerin zu einem schnell eindringenden und daher beliebten Durchfärbungsmittel.

Alaunhämatoxylin nach Ehrlich. In 100 ccm absoluten Alkohol bringt man 2 g Hämatoxylin, 10 ccm Eisessig, 100 ccm Glyzerin, 100 ccm Wasser und gegen 3 g Alaun. Das

Gemisch bleibt in offener Flasche stehen, bis es dunkelrot ist. Wird es dann gut verschlossen, so hält es sich Jahre lang. Gibt auf Schnitten und bei Stückfärbung gute Kernfärbung.

Hämateïnlösung I. A. Es wird gemischt zu gleichen Teilen Glyzerin, eine Alaunlösung und eine Hämateïntinktur. Die Alaunlösung besteht aus 9% Alaun, 3% Eisessig und $^1/_{10}$% Salizylsäure in dest. Wasser. Die Hämateïntinktur besteht aus einer 1%igen Hämatoxylinlösung in 70%igem Alkohol, die 6—8 Wochen offen gestanden hat. Die Oxydation schreitet jedoch immer weiter fort und beeinträchtigt die Haltbarkeit. Für Schnitte und zum Durchfärben anwendbar.

Hämakalcium: 1 g Hämateïn und 1 g Chloraluminium werden fein zerrieben und in 10 ccm Eisessig und 600 ccm 70%igem Alkohol heiß oder kalt gelöst. Zum Schluß setzt man 50 g Chlorkalcium zu. Nicht gut haltbar. Färbt nicht so präzis wie Alaunhämatoxylin, gibt aber doch bisweilen (Protozoen) sehr schöne Bilder. Kommt auch als Ersatz für jenes in Betracht, wenn die Objekte nicht in Wasser gebracht werden dürfen. Reagieren diese neutral oder schwach sauer, so ist ein Ausziehen der Farbe hinterher nicht nötig. Man bringt sie daher am besten vorher in angesäuerten Alkohol. Auswaschen in neutralem Alkohol, oder wenn sie darin nicht blau werden, in 70%igen Alkohol + 2% Chloraluminium. Ist Ausziehen der Farbe nötig, so geschieht dies mit saurem Alkohol.

Mucin Hämateïn, wässrig: 0,2 g Hämateïn werden mit einigen Tropfen Glyzerin verrieben; dann 0,1 g Chloraluminium, 40 ccm Glyzerin und 60 ccm dest. Wasser hinzugegeben.

Alkoholisch: 0,2 g Hämateïn, 0,1 g Chloraluminium, 100 ccm Alkohol von 70%, 1—2 Tropfen Salpetersäure.

Beide eignen sich zur Schleimfärbung. Besonders die wässrige Lösung färbt schnell und nur den Schleim; doch ist da, wo der Schleim im Wasser zum Quellen neigt, wie in

der Haut von Fischen, die alkoholische Färbung vorzuziehen. Kernfärbungen läßt man vorausgehen.

2) Hämatoxylin-Eisen, -Chrom, -Kupfer und -Molybdän.

Während die Tonerde zugleich mit dem Hämateïn den Objekten geboten werden, findet hier meist eine getrennte Behandlung statt. Die Gewebe werden zuerst gebeizt (siehe p. 113); am häufigsten werden hierzu Eisensalze verwendet. Bei den Chrom-Hämatoxylin-Färbungen kann das Hämatoxylin als Beize aufgefasst werden.

Eisen-Hämatoxylin. Nur für Schnitte.

1. Nach **Benda.** Die Schnitte kommen auf einen Tag in Liquor ferri sulfurici oxydati Pharm. Germ., der auf die Hälfte mit Wasser verdünnt ist; nachdem darauf erst in destilliertem, dann in gewöhnlichem Wasser gut ausgewaschen ist, bringt man sie in eine 1%ige wässrige, reife Hämatoxylinlösung, bis sie schwarz geworden sind. Dann wieder abwaschen und unter Kontrolle differenzieren in 30%iger Essigsäure.

2. Nach **Heidenhain.** Als Beize wird eine Lösung von schwefelsaurem Eisenoxyd-Ammoniak verwendet. Man nehme hierzu nur klare, violette Kristalle. Die Schnitte werden in der 1½ bis 4%igen Lösung ½ bis 12 Stunden lang gebeizt. Man tut gut, die Objektträger in der Flüssigkeit senkrecht zu stellen, damit sich nicht Niederschläge von Eisenoxyd auf ihnen absetzen. Dann wird kurz in Wasser abgespült und in einer ½%igen reifen Hämatoxylinlösung ½ Stunde gefärbt. Hierauf wieder zurück in den Eisenalaun zum Differenzieren. Dabei muß unter dem Mikroskop der Fortschritt der Differenzierung kontrolliert werden (ev. mit Wasserimmersion). Durch Abspülen in Leitungswasser kann die Entfärbung sofort unterbrochen werden. Ist die Farbe in der gewünschten Weise ausgezogen, so wird gut in fließendem Wasser abgewaschen.

Modifikation von Heidenhain. Gebeizt wird 6—24 Stunden in $2\frac{1}{2}$%iger Eisenalaunlösung, gefärbt etwa ein Tag in 1%iger reifer Hämatoxylinlösung. Differenzierung wie oben.

Bei Eisenhämatoxylin-Färbungen sind ätherische Öle beim Überführen in Kanadabalsam zu vermeiden. Die Vorbehandlung der Objekte (Fixierung) übt keinen wesentlichen Einfluß auf die Färbbarkeit aus. Dieser Umstand macht diese Färbung besonders beliebt nach Fixieren mit Osmium und Chromgemischen. Die Farbe ist je nach der Dauer des Beizens und Färbens und nach der Oxydationsstufe des Hämatoxylins blau, violett oder schwarz. Da die chromatischen Bestandteile des Kerns sehr präzis gefärbt werden, findet diese Methode in der Zellforschung häufig Anwendung. Es ist darauf zu achten, daß die Schnitte eines Objektträgers genau gleiche Dicke besitzen, damit die Differenzierung gleichmäßig fortschreitet. Aber auch wenn diese Bedingung erfüllt ist, so wird es bei Schnitten, die verschiedene Organe treffen, nicht immer möglich sein, ein in allen Teilen gut differenziertes Schnittpräparat zu erhalten. Denn da die Gewebe die Farbe mit verschiedener Intensität festhalten, muß man sich häufig damit begnügen, auf einem Objektträger nur auf einen bestimmten Gewebekomplex zu differenzieren.

Nachfärben mit Pikrinsäure, mit Wasserblau-Pikrinsäure, Lichtgrün, Säurefuchsin, Pikrofuchsin usw.

Eisenhämatoxylin nach Hansen. In diesem Gemisch wird die Beize in der Farblösung dem Objekt dargeboten. Sie hat zugleich den Zweck, das Hämatoxylin zu oxydieren. Man löst in der Wärme (auf dem Wärmeofen) 10 g reinen Eisenalaun in 150 g dest. Wasser. Ferner wird 1,6 g Hämatoxylin in 75 g warmem dest. Wasser gelöst. In die erkaltete Hämatoxylinlösung wird die ebenfalls kalte Alaunlösung unter stetem aber mäßigem (um zu starke Oxydation durch die Luft zu verhindern) Umrühren eingegossen. Dann wird durch langsames Erhitzen in einem

Kolben die Oxydation durch das Alaun beschleunigt. Doch lasse man höchstens ½—1 Minute sieden. Die Farbe wird erst braun, dann blau, dann dunkelviolett. Die fertige Lösung soll dunkelbraun sein. Ein geringer Teil des Farbstoffs bleibt ungelöst, darf aber nicht abfiltriert werden.

Die Lösung hält mehrere Monate. Die Aufbewahrung geschieht am besten in einer gut verschlossenen Flasche mit einem Überschuß des Farblacks. Vor dem Gebrauch ist zu filtrieren. Man färbt die Schnitte Minuten bis mehrere Stunden. In letzterem Falle sind sie stark überfärbt, jedoch nicht gleichmäßig, so daß auch in diesem Falle nicht immer ein Differenzieren nötig wird. Ist es doch erforderlich, so verwendet man am besten verdünnte Schwefel- oder Essigsäure. Meist genügt kurze Färbung eventl. unter Erwärmung auf 40°—50°, ohne Differenzierung. Abspülen in dest. Wasser bis zu zehn Minuten lang, dann Leitungswasser. Das Chromatin wird schwarz, auch manche Plasmastrukturen treten sehr schön hervor. Gegen saure Plasmafarben ist die Färbung sehr resistent.

Gegenüber der getrennten Eisenhämatoxylinfärbung hat diese den Vorzug der einfacheren Handhabung. Auch spielt hier eine verschiedene Schnittdicke auf demselben Objektträger kaum eine Rolle. Bei altem Alkoholmaterial findet man außerdem häufig, daß nach der getrennten Methode eine fein abgestufte Differenzierung nicht möglich ist, da der Farblack ziemlich plötzlich weicht. Auch dieser Nachteil fällt hier weg, wenngleich gesagt werden muß, daß manches alte Material auch dieser Färbung widersteht und nur wenig differenzierte braune Tönungen ergibt, wo das Heidenhainsche Verfahren noch bessere Resultate ermöglicht.

Hämatoxylin-Chrom. Zum Durchfärben geeignet. Die Stücke, die vorteilhaft in Alkohol oder Pikrinsäure fixiert worden sind, werden in einer ⅓ %igen Hämatoxylinlösung (in dest. Wasser) etwa 12—24 Stunden gebeizt, dann eben-

solange in eine $\frac{1}{2}$%ige wässrige Lösung von Kaliummonochromat gebracht. Die Chromsalze müssen vor dem Einbetten gut mit Wasser ausgewaschen werden. Bei der Einbettung sind ätherische Öle zu vermeiden. Diese Methode ergibt sehr gute Resultate, wenn sie gelingt; was leider nicht immer der Fall ist. Bei Material, das in Säuren fixiert ist, lege man besondere Sorgfalt auf das Auswaschen derselben.

Eine modifizierte Methode wurde von Apáthy angegeben. Da das Mißlingen der Färbung unter anderem auch auf Zersetzung der chromsauren Salze (Säureabspaltung) zurückgeführt wurde, so versuchte Apáthy diesem Übelstand dadurch zu begegnen, daß er diese Salze in Alkohol von 70 bis 80% löste.

Chromalaundioxyhämateïn nach Hansen. 10 g chemisch reiner Chromalaun werden in 250 ccm dest. Wasser gelöst und die Lösung gekocht, bis sie grün wird. In die noch heiße Lösung bringe man 1 g Hämatoxylin unter ständigem Umrühren. Nach dem Erkalten setzte man 0,5 g Schwefelsäure (also etwa 5 ccm einer 10%igen Schwefelsäure) hinzu. Außerdem löse man 0,55 g Kaliumbichromat in 20 ccm warmem Wasser. Nach dem Erkalten wird diese Lösung tropfenweise unter stetem Umrühren in die erste Lösung eingegossen. Durch das Kaliumbichromat findet nun eine Oxydation des Hämatoxylins statt, die dadurch beschleunigt wird, daß man die Mischung erhitzt und etwa 2 Minuten lang unter stetem Umrühren sieden läßt. Dadurch wird die Oxydation und die Lackbildung vollendet. Ein unlöslicher Überschuß des Lacks schadet nicht, doch muß vor dem Gebrauch stets filtriert werden.

Die Lösung hält sich sehr lange. Die Schnitte werden 5—10 Minuten eventl. unter Erwärmung auf 50° gefärbt. Überfärben ist auch bei stundenlanger Einwirkung kaum zu befürchten. Man erzielt eine äußerst scharfe, tiefblaue Kernfärbung, doch wird auch das Plasma etwas mitgefärbt. Ist stärkere Plasmafärbung erwünscht, so nehme man statt

der 0,5 g Schwefelsäure nur die Hälfte bis ein Fünftel so viel. Ebenso kann durch vermehrten Zusatz der Schwefelsäure eine reine Kernfärbung erzielt werden. Gegen Säuren ist diese Chromalaunfärbung sehr widerstandsfähig.

Auch für Stückfärbung ist diese Mischung geeignet. Man färbt kleine Stücke 3—4 Tage, wäscht gut in dest. Wasser aus, das öfter zu wechseln ist und am besten vorher durch Auskochen von Sauerstoff befreit wird. Um die Aufnahme von Sauerstoff zu verhindern, fülle man das Gefäß bis an den Stöpsel voll. Hat man in dieser Weise 3—5 Tage ausgewaschen, so kann man das Objekt in die aufsteigende Alkoholreihe bringen auch dann, wenn sich das Wasser noch etwas gefärbt hat. Bei der Durchfärbung erreicht man ebenfalls in der Hauptsache eine Kernfärbung, doch werden auch Plasma, Bindegewebe, Muskeln usw. gut getönt.

Kupfer-Hämatoxylin. Für Schnitte von Material, das in Flemmings Gemisch fixiert ist. Die Schnitte kommen 2 Tage in konzentrierte Lösung von Kupferacetat, werden gut ausgewaschen und dann einige Minuten in eine 1 %ige wässrige Hämatoxylinlösung eingetaucht. Differenzieren der Schnitte in $^1/_5$ %iger Salzsäure bis sie hellgelb sind. Die Säure wird dann in der Kupferlösung entfernt, wo die Schnitte blaugrau werden. Auswaschen in Wasser.

Molybdän-Hämatoxylin. Beizen in ($^1/_{10}$ %iger) Phosphormolybdänsäure, färben in 1 %iger reifer Hämatoxylinlösung, der 6—10 % Chloralhydrat zugefügt ist.

Teerfarbstoffe.

Über die Teerfarbstoffe als Kern- und Plasmafarben siehe S. 114.

Kernfärbung mit Teerfarbstoffen.

Während die Plasmafarben nur progressiv angewandt werden, kommt für die Kernfarbstoffe sowohl progressive als auch regressive Färbung in Betracht. Zur progressiven Kernfärbung eignet sich nur das Thionin, das Methylgrün

und das wenig gebrauchte Methylviolett. Thionin kann progressiv und regressiv verwendet werden.

Differenzieren der Teerfarbstoffe.

Die Farben werden in Anilinwasser, in Wasser oder wenn nötig, in Alkohol gelöst. Anilinwasser (Anilin mit Wasser schütteln; stets frisch zu bereiten) vermag am meisten Farbstoff zu lösen und eine derartige Farbstofflösung hat höhere Färbekraft als eine rein wässrige oder alkoholische.

Es wird zunächst überfärbt und dann differenziert. Daher muß man sorgfältig, d. h. lange genug färben. Aus demselben Grunde wendet man auch meist starke Lösungen an. In diesen bleiben Schnitte — und nur solche oder sehr dünne Objekte können in Betracht kommen — am besten mehrere (bis zu 24) Stunden, wenn auch in manchen Fällen schon wenige Minuten genügen.

Differenziert wird mit neutralem oder ganz schwach angesäuertem Alkohol oder mit Anilinwasser. Die entfärbende Kraft des Alkohols kann auch durch Zusatz von Anilin verstärkt werden, ebenso wie man die des Anilins durch Mischen mit Xylol abschwächen kann. Setzt man dem Anilin einen sauren Farbstoff (Eosin oder Pikrinsäure) zu, so differenziert das Gemisch stärker als reines Anilin und ergibt gleich eine Doppelfärbung. Vor dem Differenzieren werden die Schnitte kurz in Wasser abgespült, dann in der Entfärbungsflüssigkeit gelassen bis die Farbwolken nachlassen abzuströmen. Gut differenzierte Schnitte sind ziemlich durchsichtig; bei Geweben, die in Chrom- und Osmiumgemischen fixiert sind, kommt die braune Farbe zum Vorschein. Neutraler Alkohol entfärbt ruhende Kerne viel schneller als Mitosen. Die Differenzierung wird unterbrochen entweder durch Abspülen in Wasser, oder dadurch, daß man das Objekt gleich durch das Zwischenmedium in Balsam bringt.

Zwischenmedien, die an sich nicht differenzierend wirken, sind Cedernöl, Bergamottöl und Xylol. In diese geht man direkt nach dem Differenzieren, wenn vorher schon stark genug differenziert ist. (Differenzieren in saurem Alkohol.) Hat man dagegen mit neutralem Alkohol entfärbt, wobei die Farbe dem Plasma meist nicht vollständig entzogen wird, dann läßt man die Schnitte vorher noch Nelkenöl oder Anilin passieren, die beide die Differenzierung noch weiterführen. Dann kommen auch derart behandelte Objekte in Xylol, Cedernöl oder Bergamottöl, um die Entfärbung zu unterbrechen, und von da erst in Kanadabalsam. Chloroform ist zu vermeiden.

Die Fixierung der Objekte spielt keine entscheidende Rolle, doch färbt sich Chromosmium-Material oft besser und distinkter (obwohl langsamer) als solches, das in Sublimat fixiert ist. Safranin färbt letzteres direkt schlecht.

Wir besprechen zunächst die eine direkte Färbung ergebenden Kernfarben.

Thionin. (Lauths Violett.) Man färbt einige Minuten oder länger in ganz dünner oder konzentrierterer wässriger Lösung. Auswaschen in Wasser. Ein Zuviel an Färbung löst sich in verdünntem 50—70 %igen Alkohol schnell aus. Dagegen zieht in 96%igem Alkohol meist nur noch sehr wenig aus, so daß man sich den gewünschten Färbungsgrad in hochprozentigem Alkohol sozusagen fixieren kann. Thionin gibt prachtvolle Kernfärbungen selbst nach Osmiumfixierung. Es wirkt außerdem metachromatisch, Bindegewebe und manche Drüsen (Schleim) und Granula werden nämlich bordeauxrot. Eine Nachfärbung ist daher nur selten ratsam, mit Eosin aber gut ausführbar. Anfängern ist das Thionin wegen der leichten Handhabung besonders zu empfehlen. Ein großer Nachteil des Thionin besteht darin, daß es in Kanadabalsam bald ausbleicht.

Für Schleimfärbungen ist es sehr gebräuchlich. Nach Hari verfährt man hierbei wie folgt: Fixieren in gesättigter

(7%iger) Lösung von Sublimat in 0,5%iger Kochsalzlösung; einbetten in Zelloidin. Auf den Schnitten ist das Zelloidin mit Äther-Alkohol aufzulösen, dann abs. Alkohol, 3 Minuten in Wasser, 10 Minuten wieder in die erwähnte Sublimatlösung, ½ Minute in Alkohol abs., ebensolange in Wasser, 3 Minuten in 1%ige Thioninlösung, 2 Minuten in dest. Wasser, 1—2 Minuten in abs. Alkohol. Differenzieren 1 Minute oder länger in einem Gemisch von 1 Teil Karbolsäure, 2 Teile Xylol und 3 Teile Nelkenöl. Gut auswaschen in reinem Xylol. Kanadabalsam. Jodkali zum Auswaschen des Sublimats ist zu vermeiden. Der Schleim wird rotviolett.

Toluidinblau. Wird wie das Thionin verwendet, dem es in seinen Eigenschaften gleicht. Es ist ein guter Kernfarbstoff, und wird am besten in einer 0,3—1%igen Lösung benutzt. Dem Thionin wird es oft wegen der etwas größeren Haltbarkeit der Färbung vorgezogen.

Für Nervenfärbung (Tigroid und Fibrillen) bringt man die Schnitte (nach Lenhossék) in konzentrierte, wässrige Toluidinblaulösung, färbt kurz in Erythrosinlösung nach und differenziert in Alkohol. Auch zur vitalen Nervenfärbung wird es empfohlen. Wie das Thionin ist es auch zum Färben von Schleim zu verwenden.

Methylgrün (syn. Lichtgrün). Es wird aus Methylviolett gewonnen, das in geringen Mengen unzersetzt in ihm enthalten ist. Es kann dies durch Ausschütteln der wässrigen Lösung mit Chloroform entfernt werden.

Da das Methylgrün gegen Alkalien sehr empfindlich ist, so darf es nur mit neutralen oder schwachsauren Medien in Berührung kommen.

Es wird hauptsächlich verwendet zum Färben von frischem oder eben erst abgetötetem Gewebe. Im ersten Falle wirkt der schnell eindringende in schwacher Essigsäure angewendete Farbstoff selbst mit als Fixierungsmittel. Es gibt eine gute Kernfärbung, färbt schnell ohne zu überfärben. In fixierten Präparaten erscheint der ruhende Kern

bläulichgrün, die Mitosen dagegen leuchtend grün. In seinen Färbungen tritt die Affinität zum Chromatin mehr in den Vordergrund als bei anderen Farbstoffen. Auch für Schleim- und Knorpelfärbung zu empfehlen.

Meist verwendet man es in dünner Lösung, der 0,5 bis 1% Essigsäure zugesetzt ist, oder man löst es in physiologischer Kochsalzlösung oder in $^1/_{10}$ bis $^1/_2$%iger Osmiumsäure. Auch dem Gemisch von Ripart und Petit (siehe S. 44) läßt es sich beimengen.

Mit Plasmafarben gemischt wird es hauptsächlich in dem **Ehrlich-Biondi**schen Gemisch gebraucht (S. 147).

Die Präparate sind nach dem Färben in Wasser gut abzuwaschen. Alkohol zieht die Farbe stark aus. In Kanadabalsam bleicht sie schneller als in wässrigem Einschlußmittel.

Bismarckbraun. Man verwende konzentrierte, wässrige Lösungen, die mit etwas Essig- oder Osmiumsäure versetzt sind, oder man nehme auf 3 Teile der konz. wässrigen Lösung 1 Teil 90%igen Alkohol. Im ersten Fall ist es nötig, die Lösung öfter zu filtrieren. Kerne und Schleim werden stark und schnell gefärbt, überfärben sich aber auch leicht. In diesem Falle muß mit verdünntem oder angesäuertem Alkohol ausgewaschen werden. Infolge der großen Affinität zu Knorpel eignet sich das Bismarckbraun auch zu embryologischen Untersuchungen. Man lasse die Schnitte nicht zu lange in der Farbe. Vorfärben des ganzen Stückes mit Boraxkarmin ist sehr zu empfehlen.

Kann auch zum Durchfärben gebraucht werden. Die Farbe hält sich in Balsam und in Glyzerin.

Gentianaviolett (Methylviolett mit Zusatz von Kristallviolett). In starker wässriger oder alkoholischer Lösung gebraucht. Ist jedoch auch in sehr verdünnter Lösung zu verwenden. Differenziert wird in neutralem oder schwach saurem Alkohol, oder man bringt, wenn die Farbe zu stark auszieht, die gefärbten Objekte erst in eine Lösung von 1 g Jod und 2 g Jodkalium in 300 ccm Wasser, bis sie schwarz

sind, von da in neutralen Alkohol, wo sie grau werden, und differenziert in Nelkenöl. Die Färbung bleicht mit der Zeit aus.

Eine vorzügliche Kernfärbung erhält man nach der von Bizozzero angegebenen Methode. Die Schnitte werden 5—10 Minuten gefärbt, 5 Sekunden in Alkohol abs. ausgewaschen, 2 Minuten in Jodjodkalium (Lugolsche Lösung) gebracht, dann wieder 20 Sekunden in Alkohol abs., 30 Sekunden in 1%ige wässrige Chromsäure, 15 Sekunden wieder in Alkohol abs. und dann nochmals 30 Sekunden in Chromsäure, ebensolange in Alkohol abs., dann in Nelkenöl und von da in Balsam. Je nach der Schnittdicke und der Art des Materials sind die Zeiten etwas zu modifizieren. Differenziert man sehr stark, so bleiben nur noch die Mitosen und auch die Nukleolen tiefblau gefärbt.

Man kann auch eine Plasmafärbung damit verbinden, indem man an Stelle des Alkohols abs. eine konzentrierte Lösung eines sauren Farbstoffs in 95—100%igem Alkohol (Orange G., Rubin) setzt.

Safranin. Es wird meist in konzentrierter wässriger oder alkoholischer Lösung angewendet, oder man versetzt die Lösung mit Anilin. In diesem Falle nehme man eine konzentrierte Lösung in 2%iger Anilinlösung, erwärme auf 60° und filtriere. Safranin färbt schnell, doch lasse man die Schnitte mehrere Stunden bis einen Tag in der Farbe. Differenziert wird wie bei Gentianaviolett in hochprozentigem Alkohol, der höchstens eine Spur angesäuert werden darf, da sonst die Farbe momentan auszieht. Auch die Vorbehandlung mit Jodjodkalium wie bei Gentianaviolett wird empfohlen. Dies kann auch durch einen zweiten, sauern Farbstoff ersetzt werden (Lichtgrün). Man bringt dann die etwa 1 Tag lang gefärbten Schnitte in eine 1%ige Lösung von Lichtgrün in 96%igem Alkohol und differenziert darin etwa $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{2}$ Minute. (Benda.)

Safranin ist ein vorzüglicher und beständiger Kernfarbstoff, doch kommt es nur bei Chrom- und Osmiummaterial

voll zur Geltung. Auch zur Färbung von Schleim und elastischen Fasern ist es geeignet. Doch ist die Farbe je nach der Behandlung, dem Differenzierungsgrad und anderen nicht immer feststellbaren Bedingungen verschieden.

Dahlia. In wässriger oder alkoholischer Lösung gebraucht. Differenziert wird in schwacher Essigsäure, oder es wird diese dem Farbstoff gleich beigegeben, z. B. 70 %iger Alkohol 100 Teile, Eisessig 8 Teile, Dahlia bis zur Sättigung. Auch in Verbindung mit vorausgegangener Stückfärbung zu empfehlen. Die mit Flemmings Gemisch fixierten Stücke werden in Alaunkarmin durchgefärbt, und die Schnitte mit Dahlia nachbehandelt. Dann Wasser, Alkohol und nochmals kurz in Alaunkarmin. Die hierbei zu verwendende Dahlialösung setze man folgendermaßen an: Dahlia 0,2 Teile; 50 %igen Alkohol 20 Teile; nachdem sich der Farbstoff gelöst hat, füge man nochmals 20 Teile 50 %igen Alkohol und 2 Teile Salpetersäure hinzu. Differenziert wird in verdünnter Essigsäure und ausgewaschen in Wasser. Sehr geeignet zum Hervorheben elastischer Fasern (blau). Die Kerne werden rot (Unna, Hansen).

Fuchsin. Da es sich in Wasser schlecht löst, wird meist eine starke Lösung in 50 %igem Alkohol verwendet (auch in 2 bis 5 % Karbolwasser). Doppelfärbung mit Methylenblau oder Jodgrün.

Nigrosin, wasserlöslich. Konzentriert und ganz verdünnt angewandt. Für Nervenzellen zu empfehlen. Färbt die Fasern, nicht aber die Zellen.

Benzoazurin. Guter Kernfarbstoff für in Sublimat fixierte Objekte. Man färbt bis zu ½ Stunde in einer 1 %igen Lösung, wäscht in Wasser aus und geht von da gleich in 96 %igen Alkohol, da schwacher Alkohol die Farbe stark auszieht.

Methylenblau. Es ist das Salz der Base Tetramethylthionin, und kommt als salzsaures Salz und als Chlorhydrat in den Handel. Es ist leicht in Wasser, etwas weniger gut in Alkohol

löslich. Bei längerem Stehen bildet es Methylenazur und Methylviolett (rotstichiges oder polychromatisches Methylenblau). Auch das Pulver kann schon mit Beimengungen von Methylenazur und Methylviolett bezogen werden; denn für manche Färbungsmethoden (Färben von Zellgranulationen) ist ein derartig unreines Methylenblau erwünscht. Nur absolut reinen Farbstoff darf man jedoch bei Vitalfärbungen verwenden. Die Ungiftigkeit und die spezielle Affinität zum Nervengewebe haben dem Methylenblau einen weiten Anwendungsbereich bei Färbungen intra vitam gesichert. Im fixierten Gewebe färbt es die Kerne und Kernkörperchen, Zellgranulationen und Mucin. Es überfärbt nie, kann daher in starker Konzentration angewendet werden.

Spezielle Verwendung des Methylenblaus.

Imprägnieren von Lymphräumen, Saftkanälen, Epithelien usw. Man bringt dünne, frische Membranen (Schleimhäute oder seröse Membranen) für 10 bis 20 Minuten in eine ¼ bis ½%ige Lösung von Methylenblau in physiologischer Kochsalzlösung, wäscht in physiol. Kochsalzlösung und darauf in einer Lösung von pikrinsaurem Ammonium aus, und läßt sie dann ½ bis 1 Stunde in einer reinen Lösung von pikrinsaurem Ammonium stehen. Schließlich kommen sie in ein Gemisch, das zu gleichen Teilen aus Ammoniumpikrat und Glyzerin besteht. Oder man bringt die Objekte nach dem Auswaschen mit physiolog. Kochsalzlösung auf ½ bis 1 Stunde in eine Ammoniummolybdatlösung; dann wird in dest. Wasser ausgewaschen, entwässert und durch Xylol in Balsam übergeführt. Damit sich bei dieser Behandlung beim Auswaschen in Wasser das Epithel nicht von der Oberfläche ablöst, tut man gut, zu je 50 ccm der Ammoniummolybdatlösung 3 Tropfen einer ½%igen Osmiumsäurelösung hinzuzufügen.

Die Zellgrenzen treten bei dieser Färbung deutlich hervor, häufig sind auch die Kerne und bisweilen auch die

Interzellularbrücken gefärbt. Die Saftlücken, Saftkanäle usw. erscheinen weiß (ungefärbt) in der blauen Grundsubstanz. Bisweilen wird das Bild auch umgekehrt.

Nervenfärbung mit Methylenblau. Der Farbstoff wird den Geweben dargeboten entweder indem man eine Methylenblaulösung in die Gefäße des frisch getöteten Tieres injiziert, oder indem man die ausgeschnittenen Gewebe mit der Farblösung durchtränkt; schließlich kann man auch dem in Scheiben geschnittenen Organ (Gehirn), die Farbe als Pulver mit einem Pinsel aufstäuben. Als Lösungsmittel bedient man sich der physiologischen Kochsalzlösung; die Konzentration der Farbe ist verschieden. Für Wirbellose nicht über ¼%; besser bedient man sich einer schwächeren Lösung. Besonders gilt dies beim Färben durch Eintauchen. Je nach der Konzentration der Farbflüssigkeit und der Art der Objekte bleiben die Stücke Minuten bis mehrere Stunden (bei Konzentr. 1: 100 000) darin (markhaltige Nerven der Wirbeltiere am längsten). Dann wäscht man je nach der angewandten Konzentration eine Stunde (1 : 1000) oder nur ganz kurz (1 : 100 000) in physiolog. Kochsalzlösung aus.

Das Wasser, das für die Farblösung verwendet wird, muß gut destilliert, das Kochsalz vollständig rein sein. Ebenso müssen alle Flaschen und Gefäße, die in Anwendung kommen, nacheinander mit starker Salzsäure, dann mit Wasser, mit Alkohol und schließlich mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen werden. Hat sich ein Niederschlag in der Lösung gebildet, so ist diese vor dem Gebrauch zu erwärmen und zu filtrieren. Zum Färben durch Eintauchen der Gewebe kann man auch eine Lösung in reinem Wasser verwenden.

Die Gewebe sollen möglichst frisch sein. Doch erzielt man bei Warmblütern noch nach mehreren Stunden, bei Kaltblütern sogar nach einigen Tagen brauchbare Färbungen. Die Tiere werden am besten durch Entbluten getötet. Die Gefäße sind mit warmer physiol. Kochsalzlösung durchzu-

spülen. Auch die Farblösung muß Körperwärme haben. Nach der Injektion werden die Gewebsstücke ausgeschnitten und auf 1/4 bis 2 Stunden mit etwas Farblösung in offener Schale in den Thermostaten gestellt.

Die Färbungsverfahren sind mannigfaltig. Im allgemeinen zieht man für höhere Wirbeltiere die Injektion in Blutgefäße oder Körperhöhlen, für niedere und Wirbellose das Einlegen der Organe in die Farblösung vor.

Es läßt sich stets nur ein Teil der Nervenelemente färben. Diese können aber dann in ihrem ganzen Verlauf leicht verfolgt werden. Doch gibt die Färbung auch zu Täuschungen Veranlassung. Die erst stark gefärbten Gewebe verblassen unter dem Deckglas bald, nehmen aber die ursprüngliche Färbung wieder an, sobald man sie der Luft aussetzt. — Ob hierbei der Sauerstoff oder das Ammoniak der Luft wesentlich in Betracht kommt, ist nicht festgestellt. — Man nehme beim Färben durch Eintauchen möglichst wenig Flüssigkeit.

Eine besondere Methode ist erforderlich, wenn Dauerpräparate gewonnen werden sollen. Die erste Forderung dabei ist, daß die Gewebe nach dem Färben fixiert werden und zwar ohne daß dadurch die Färbung beeinträchtigt wird. Nur wenig Agentien haben sich bisher als hierfür geeignet erwiesen.

Dogiel fixiert mit einer gesättigten, wässrigen Lösung von pikrinsaurem Ammonium. Dieses bildet mit dem Methylenblau einen dunkelvioletten Niederschlag, der sich in einem Gemisch von Glyzerin (1 Teil) mit einer wässrigen gesättigten Lösung von Ammoniumpikrat (1 Teil) kaum verändert. Eine Härtung tritt dabei nicht ein; daher ist das Verfahren nicht anwendbar, wenn die Stücke noch geschnitten werden sollen. Für dünne Häute, Gewebe usw. ist der Gang der Behandlung wie folgt: die Präparate, auf denen die Nerven intensiv gefärbt sind, kommen zum Fixieren in eine bei Zimmertemperatur gesättigte, wässrige Lösung von pikrinsaurem Ammonium (in einer Glasschale mit 30—100 ccm Inhalt). Darin bleiben sie je nach ihrer

Größe und Dicke 2 bis 24 Stunden. Wird die Fixierungsflüssigkeit durch abgelöste Epithelien und durch Schleim trübe, so muß sie gewechselt werden. Dann kommen die Stücke auf dem Objektträger in ein Gemisch, das zur Hälfte aus dem Fixierer, zur Hälfte aus Glyzerin besteht, und werden mit dem Deckglas bedeckt. Nach einigen Tagen sind die Präparate vollständig durchsichtig.

Bethe fand ein Verfahren, durch das die Gewebe beim Fixieren auch genügend gehärtet werden, um sie schneidfähig zu machen. Er benutzte molybdänsaures Ammonium, das die Leukobase*) des Methylenblaus als weißes, allmählich sich bläuendes Salz ausfällt. Je nach der Dicke der Objekte werden etwas verschiedene Mischungen bei der Fixationsflüssigkeit gewählt. **Bethes** Verfahren wurde von **Dogiel** vereinfacht und soll in dieser Form gleich leistungsfähig sein. Danach werden die gefärbten Präparate direkt in eine frisch bereitete, wenn trüb, dann filtrierte 5—8%ige Lösung von Ammoniummolybdat gebracht. Die Menge hängt von der Größe der Objekte ab (20 ccm für kleine, 300 ccm für etwa 5—10 cm große Stücke). Kleine Präparate bleiben darin bei Zimmertemperatur 10 Minuten bis 2 Stunden, große bis zu 24 Stunden. Dann werden die Stücke in viel dest. Wasser (eventl. öfter wechseln) ausgewaschen. Nach ½ bis 3 Stunden kommen sie in absoluten Alkohol, doch möglichst kurz (¼ bis 3 Stunden), da darin die Farbe etwas auszieht. (Doch macht sich dies erst nach mehreren Stunden unangenehm bemerkbar.) Eingeschlossen wird in Xyloldammarlack oder Kanadabalsam. Sollen die Objekte geschnitten werden, so wird in Zelloidin eingebettet und dieses in 70%igem Alkohol gehärtet. Kann nicht sofort geschnitten werden, so bringt man sie aus dem 70%igen Alkohol in

*) Die meisten organischen Farbstoffe werden durch reduzierende Mittel in farblose Verbindungen, sog. Leukoverbindungen übergeführt. Sie enthalten entweder ein Sauerstoffatom weniger, oder häufiger zwei Wasserstoffatome mehr. Durch Oxydation kann der Farbstoff wieder hergestellt werden.

Wasser, wo sie 2—3 Tage aufgehoben werden können, ohne daß die Färbung dadurch leidet. Die Schnitte können noch nachgefärbt werden (Alaunkarmin). Sie werden in absolutem Alkohol entwässert und durch Xylol in Xyloldammarlack übergeführt. Einbetten in Paraffin ist weniger zu empfehlen. Das Verfahren kann auch Anwendung finden auf Präparate, die nach der an erster Stelle angeführten Methode hergestellt worden sind.

Apáthy gibt eine Modifikation des **Dogielschen** Verfahrens an, die im wesentlichen darin besteht, daß er mit Ammoniak differenziert. Die in starker Lösung gefärbten Stücke werden erst in Salzwasser ausgewaschen, die in schwacher Lösung gefärbten kommen direkt in eine konzentrierte, wässrige Lösung von Ammoniumpikrat, ohne freie Pikrinsäure, doch mit etwas Ammoniak (5 Tropfen auf 100 ccm) oder statt dessen in eine 1—2%ige frische Lösung von Ammoniumkarbonat, die mit Ammoniumpikrat gesättigt ist: darin läßt er die Objekte etwa 1 Stunde oder mehr, am besten im Dunkeln, führt sie dann in wenig 50%iges Glyzerin über, das mit Ammoniumpikrat gesättigt ist, läßt sie hier gut durchtränkt werden, und bringt sie dann in ein Gemisch, das aus 1 Teil kaltgesättigter Zuckerlösung, 1 Teil kalt gesättigter Gummilösung und 2 Teilen 50%igem Glyzerin besteht und ebenfalls mit Ammoniumpikrat gesättigt ist. Eingeschlossen werden sie schließlich in einem folgendermaßen hergestellten Gemisch: 50 g ausgesuchter Gummiarabikum und 50 g Rohrzucker werden in 50 ccm dest. Wasser gelöst und etwas (0,05 g) Thymol hinzugefügt. Die Masse erstarrt sehr bald, so daß ein Umranden des Deckglases überflüssig ist.

Plasmafärbung mit Teerfarbstoffen.

Über die Teerfarben als Kern- und Plasmafarbstoffe siehe S. 114.

Man kann unter den Plasma-Teerfarbstoffen zwei Gruppen unterscheiden. Die einen, wie Pikrinsäure, Eosin,

Orange, haben mehr Affinität zu den Muskeln, die anderen, wie Wasserblau und Säurefuchsin, zu Bindegewebe. Wünscht man diese beiden Gewebsarten färberisch gegeneinander abzuheben, so kombiniert man einen Farbstoff der einen Gruppe mit einem der anderen und zwar läßt man sie nacheinander einwirken (Eosin-Wasserblau, Orange-Fuchsin) oder man stellt sich eine Mischung her (Pikro-Fuchsin, Wasserblau-Pikrinsäure.)

Pikrinsäure. Man löst sie am bequemsten in Alkohol, Xylol oder Chloroform und bringt die Objekte nach guter Kernfärbung nicht zu lange in die schwache Lösung, da die meisten Kernfärbungen gegen Säure empfindlich sind. Man kann sie auch anderen Farbstoffen direkt beimengen (Pikrokarmin). Dem Wasserblau oder Säurefuchsin beigemischt eignet sie sich sehr gut zur Plasmafärbung nach vorausgegangener Färbung mit Eisenhämatoxylin. Auch für schwer durchlässige Totalpräparate ist die schnell eindringende Pikrinsäure bisweilen zu empfehlen. Teerfarbstoffe werden im allgemeinen stark von ihr ausgewaschen oder es bilden sich Niederschläge.

Wasserblau. Mit Pikrinsäure gemischt liefert Wasserblau auch ohne vorangegangene Kernfärbung gute Bilder. Eventl. vorfärben mit Eosin. Wasserblau-Pikrinsäure ist besonders nach Eisen-Hämatoxylinfärbung sehr zu empfehlen. Das Plasma bleibt auch bei stärkerer Tönung sehr klar und durchsichtig. Man nehme die wässrige Lösung nicht zu stark, da sie rapid färbt. In niederem Alkohol zieht es etwas aus.

Bleu de Lyon. Das wasserlösliche ist empfehlenswerter als das spirituslösliche. Man verdünnt eine konzentrierte wässrige Lösung auf die Hälfte. Meist werden die Kerne mit Karminen vorgefärbt, und zwar durch Schnittfärbung oder im Stück. Mit Karminen (Boraxkarmin) gemischt eignet es sich auch zum Färben von voluminöseren Totalpräparaten. Man gibt zu einem Teil Bleu de Lyon etwa 10 Teile Karmin.

Für embryologische Zwecke empfiehlt es sich sehr, die Objekte erst im Stück in Boraxkarmin zu färben, dann gut in Salzsäurealkohol zu differenzieren. Hierauf einbetten. Die Schnitte kommen auf wenige Minuten in eine frische, konzentrierte, wässrige Lösung von Bismarckbraun und werden hierauf solange ausgewaschen, bis nur noch der Knorpel braun ist. Dann kommen sie in eine wässrige Lösung von Bleu de Lyon (konzentriert und auf die Hälfte verdünnt), werden kurz in 70%igem Alkohol ausgewaschen, um dann in abs. Alkohol, Xylol und Balsam gebracht zu werden. Die Kerne sind rot, das Protoplasma, die Nerven, der junge Knochen und die azidophilen Granulationen blau und der Knorpel leuchtend gelbbraun.

Indigkarmin. Ähnlich wie Bleu de Lyon nach oder gleichzeitig mit Karminen angewendet. Für die Mischung ist zu empfehlen: 1 g Indigkarmin in 500 ccm Wasser oder in der gleichen Menge 5%iger Alaunlösung. Dies wird mit dem 4—20fachen an Karmalaun oder auch Hämatoxylin nach Böhmer-Hansen gemischt. Nur die alkoholische Lösung von Indigkarmin ist lange haltbar.

Orange G. Sehr guter Plasmafarbstoff. Am besten wird mit dünner ½%iger wässriger Lösung längere Zeit gefärbt; doch sind auch konzentriertere wässrige und alkoholische Lösungen brauchbar. Um zu starkes Entweichen der Farbe in Alkohol zu vermeiden, kann man ihm etwas Orange zusetzen. Es ist vorteilhaft, der Lösung etwas Salzsäure zuzufügen. Es muß dann aber hinterher wieder gut neutralisiert werden. Nach Kernfärbungen mit Hämatoxylin besonders zu empfehlen. Kann bei Eisenhämatoxylinfärbung dem Eisenalaun in schwacher Lösung zugesetzt werden. Wirkt anderen Teerfarben gegenüber als Differenzierer.

Dreifachfärbung nach Flemming. Die in Flemmings oder Hermanns Gemisch fixierten Schnitte oder dünnen Häute kommen 2—3 Tage in eine wässrige Safraninlösung, der etwas Anilinwasser zugesetzt wird. Auswaschen in

dest. Wasser; Ausziehen der Farbe in absol. Alkohol mit ganz geringem (1 ‰) Salzsäurezusatz. Die Präparate müssen aber noch bevor die Farbe nur noch von dem Chromatin festgehalten wird, also noch überfärbt kurz in dest. Wasser ausgewaschen und auf 1—3 Stunden in eine sehr starke wässrige Gentiana-Lösung gebracht werden. Wieder kurz auswaschen in destill. Wasser und dann in starke, wässrige Lösung von Orange G, die zugleich als Differenzierer wirkt. Nach wenigen Minuten, während noch blaue Farbwolken ausziehen, kommen die Präparate in absoluten Alkohol, wo zunächst bräunliche und dann violette Wolken abgegeben werden. Bevor dieser Prozeß zu Ende geht, kommen sie durch frischen absol. Alkohol und durch Nelkenöl oder Bergamottöl (in dem noch Farbe auszieht) in Dammarlack oder Balsam.

Reinke modifizierte und vereinfachte die Färbung folgendermaßen: 24 Stunden in Kalium sulfurosum; auswaschen in Wasser, 1—2 Stunden in Safranin, gut auswaschen in Wasser, 24 Stunden in Gentiana-Orangegemisch, kurz auswaschen in Wasser, kurz in absol. Alkohol, dann ebenso in Nelkenöl, Balsam. Das Gentiana-Orangegemisch stellt er her, indem er zu einer wässrigen konzentrierten Lösung von Gentiana einige Tropfen einer ebensolchen Lösung von Orange G zusetzt. Es entsteht ein neutraler Farbstoff, der die Lösung trübt. Man setzt dann Wasser zu, wodurch die Trübung verschwindet und färbt darin.

Die Färbung wurde von Flemming benutzt zur Darstellung der Centrosomen und chromatinlosen Zellstrukturen. Das Chromatin von in Teilung begriffenen Kernen wird mehr rot, ruhendes Chromatin mehr blau gefärbt. Auch zum Studium der Nucleolen verwendet.

Eosin. Die verschiedenen Eosine sind teils nur in Wasser oder nur in Alkohol, teils in beiden Medien löslich. Sie werden sehr viel in schwacher Lösung nach Kernfärbung mit Hämatoxylin gebraucht. Eigentlich soll man mit Eosin in dünner

Lösung längere Zeit oder in konzentrierter kurz vorfärben; dann muß vor der Kernfärbung gut ausgewaschen werden. Oft benutzt man nach vorausgegangener Kernfärbung 3—5 Minuten lang eine 0,5 %ige Lösung in Alkohol 70 %. Dann wird in dest. Wasser solange ausgewaschen als Farbe auszieht. Von da kommen die Schnitte direkt in abs. Alkohol. Hier bleiben sie nur solange, als gröbere Farbstoffmengen abgehen. (Bei längerer Alkoholbehandlung erreicht man nur eine blaßrosa Färbung.)

Lichtgrün S. F. In alkoholischer oder wässriger Lösung anwendbar. Schöner Plasmafarbstoff, der mit roten Kernfarben gute Bilder gibt. Über die Kombination mit Safranin siehe „Safranin".

Janusgrün. In dünner, physiologischer Kochsalzlösung (1 : 30 000) zum Färben der Zellgranula frischer Gewebe gebraucht.

Anilingrün für Schleimfärbung.

Fuchsin S., Säurefuchsin, Rubin S., Säurerubin, Magenta S. sind einander nahe verwandt. Sie sind gegen Alkalien sehr empfindlich, können daher schon durch Leitungswasser ausgezogen werden, während eine schwache Färbung durch Säuren (Essigsäure) verstärkt wird. (Anwendung in der Stoffwechselphysiologie). In schwacher (1 : 500) wässriger Lösung als Plasmafarbstoff sehr zu empfehlen. Zusatz von etwas Formol macht die Lösung lange haltbar. Wird auch viel in Gemischen verwendet.

Säurefuchsin-Pikrinsäure (Pikrofuchsin). Man sättigt eine sehr schwache Säurefuchsinlösung ($^1/_{10}$%) mit Pikrinsäure. Eignet sich besonders dazu, Bindegewebe und Muskulatur gegeneinander abzuheben, resp. als solche zu erkennen, da die Muskulatur vorzugsweise die Pikrinsäure (wird daher gelb), das Bindegewebe das Fuchsin (rot) aufnimmt.

Säureviolett. Die verschiedenen Säureviolette sind in ihrem Verhalten dem naheverwandten Säurefuchsin ähnlich, werden aber weniger gebraucht.

Triacidgemisch von Ehrlich, so genannt, weil in ihm alle drei basischen Gruppen des Methylgrüns mit den sauren Farben verbunden sind. Man stellt sich gesättigte, wässrige Lösungen von Orange G, von Säurefuchsin und von Methylgrün her. Haben diese sich durch Stehenlassen geklärt, so mischt man nacheinander: 13 Teile des Orange, 6 des Säurefuchsins, 15 dest. Wasser, 15 Alkohol (90%), 12½ des Methylgrüns, 10 Alkohol (90%), 10 Glyzerin. Vom Zusetzen des Methylgrüns an ist das Gemisch tüchtig zu schütteln. Es ist sofort gebrauchsfertig und lange haltbar.

Mayer gibt eine vereinfachte Vorschrift: 1 g Methylgrün, 2 g Orange, 3 g Säurefuchsin in 80 ccm einer Flüssigkeit gelöst, die besteht aus: 45 ccm Wasser, 10 ccm Glyzerin, 25 Alkohol von 90%. Das Methylgrün setze man zuletzt zu. Gibt eine gute, zuverlässige und haltbare Dreifachfärbung.

Ehrlich - Biondi - R. Heidenhainsches Gemisch besteht wie das Triacidgemisch aus einer Mischung von Orange G, Säurefuchsin und Methylgrün. Es ist nur anwendbar nach Fixieren in Sublimat oder weniger gut in Sublimat-Pikrinsäure. Auch nach Alkohol oder Zenker'scher Flüssigkeit erzielt man noch brauchbare Resultate, wenn diese sorgfältig ausgewaschen sind. Die Schnitte sollen nicht dicker als 10 μ sein.

Man stellt sich gesättigte wässrige Lösungen von Orange G, Säurefuchsin und Methylgrün dar (es sind mehrere Tage nötig, um gesättigte Lösung zu erhalten; öfter umschütteln), filtriert und mischt 100 ccm Orange G und 20 ccm Säurefuchsin, und gießt unter Umrühren 50 ccm Methylgrün hinzu. Nur chemisch reine Farben dürfen verwendet werden. Dieses Gemisch wird vor dem Gebrauch mit Wasser auf 1: 60—100 verdünnt. Darin wird 6—24 Stunden gefärbt. Dann wird kurz in destilliertem Wasser oder Alkohol die überschüssige Farbe ausgewaschen und in absol. Alkohol entwässert. Xylol, Balsam. Der Alkohol zieht das Methylgrün leicht aus. Reagiert er alkalisch, so wird das Rot blaß

und das Grün tritt kräftig hervor; ist er sauer, so ist die Wirkung die entgegengesetzte.

Um das schnelle Ausbleichen, das bei derartigen Schnitten eintritt, zu verhindern und zugleich um eine intensivere Färbung zu erzielen, hat man der Farblösung etwas Säure zugesetzt: Man bringt die Schnitte vor dem Färben auf 2 Stunden in Essigsäure 1: 1000 und säuert auch die Farblösung mit Essigsäure (1: 500) etwas an, so daß der Farbton karmoisinrot wird. Es ist nicht leicht, den richtigen Grad der Ansäuerung zu erreichen. Heidenhain hat besondere Vorschriften dafür gegeben.

Die beiden Färbungsmethoden sind nicht immer zuverlässig, geben aber auf gelungenen Präparaten eine schöne Dreifachfärbung. Kerne bläulich oder grünlich, Nucleolen und Plasmastrukturen rot.

Bordeauxrot, als sehr beständiger Plasmafarbstoff bei Eisenhämatoxylinfärbung zu empfehlen.

Congorot. Wird in konzentrierter wässriger und alkoholischer (Alk. abs.) Lösung verwendet. Es ist sehr säureempfindlich (wird blau). Der Farbenumschlag nach blau ist jedoch kein zuverlässiger Indikator für Anwesenheit von Säure. Es wird für Schnittfärbung, besonders für Achsenzylinder und zur Vitalfärbung benutzt.

Neutralrot. Es wird hauptsächlich für Vitalfärbung angewendet. Bei Froschlarven genügt es, sie in einer Lösung von 1: 10 000—100 000 schwimmen zu lassen. Auch überlebende Organe können darin gefärbt werden, indem man sie in physiologische Kochsalzlösung bringt, der etwas Neutralrot zugesetzt ist. Höhere Tiere (Kaninchen, Meerschweinchen, nicht auch Mäuse) ertragen subkutane oder intravenöse Injektion sehr gut. Zu diesem Zweck wird das Neutralrot in sterilisierter, physiologischer Kochsalzlösung konzentriert aufgelöst. Hiervon werden täglich ein oder mehrere Kubikzentimeter injiziert.

Zur Darstellung der Nisslschen Körper bringt man das Formolmaterial ½ Stunde in eine konzentrierte wässrige Lösung von Neutralrot, wäscht in Wasser aus und differenziert in Alkohol. Die Kerne und die Nisslschen Granula sind leuchtend rot, der Zelleib dagegen ist schwach gelb gefärbt.

Deltapurpurin, Benzopurpurin, Congo-Corinth G. zum Nachfärben nach Hämatoxylinfärbungen. Die Schnitte kommen aus etwas alkalischem Wasser in die wässrige oder alkoholische Farblösung. Das Benzopurpurin kann auch wie das Benzoazurin als Kernfarbstoff verwendet werden.

Färben mit anderen Farbstoffen.

Eisen-Brasilin. Das Brasilin wird aus dem Rotholz (auch Fernambuk- oder Sappanholz genannt, Caesalpinia brasiliensis), gewonnen. Es oxydiert an der Luft zu Brasileïn, verhält sich also ähnlich wie das Hämatoxylin. Auch die Art der Verwendung ist bei beiden ähnlich. Das Brasilin wird fast nur nach vorausgegangener Behandlung der Schnitte mit einer alkoholischen Lösung von Eisenalaun verwendet. Diese Beize, die nicht lange haltbar ist, wird dargestellt, indem man 1 g Eisenalaun (siehe auch bei Eisenhämatoxylin) in 23 ccm Wasser löst, und dazu 77 ccm Alkohol von 90 % bringt. Die Schnitte bleiben 1—3 Stunden in der Beize, werden in 70 %igem Alkohol abgespült, dann in eine ½ %ige Lösung von Brasilin in 70 %igem Alkohol auf 3—6 Stunden gebracht, entwässert und in Balsam eingeschlossen. Ein Differenzieren mit Eisenalaun ist meist nicht nötig.

Orceïn wird aus Flechten (Lecanora, Rocella u. a.) gewonnen. Löst sich in Alkalien mit violetter Farbe und wird durch Säuren gefällt. Orceïn wird vielfach zum Nachweis elastischer Fasern verwendet. Die Schnitte kommen in eine 2 %ige wässrige Orceïn-Lösung, der 2 % Eisessig zugesetzt ist, werden in Wasser ausgewaschen und schnell durch absoluten Alkohol in dickes Cedernöl gebracht, worin

sie aufbewahrt werden. Die Kerne sind blau, das Plasma rot gefärbt.

Oder (für Zelloidinschnitte durch Embryonen verwendet) 1 g Orceïn in 80 ccm Alkohol absol. und 40 ccm Wasser, dazu 40 Tropfen einer 25%igen Salzsäure. Nach 6 bis 24 Stunden werden die Schnitte in 90%igem Alkohol ausgewaschen. Alkohol absol., Öl, Balsam. Der als Knorpel präformierte Knochen wird blau, alles übrige rot.

Kernschwarz. Nach Mayer eine Eisentinte (Eisen und Gerbstoff). In verdünnter Lösung werden nur die Kerne und die Achsenzylinder gefärbt. Die Mitosen nehmen die Farbe viel stärker auf, als die ruhenden Kerne. Auswaschen einige Stunden in verdünntem Ammoniak oder einige Minuten in einer Lösung von Lithiumcarbonat (die konzentrierte Lösung mehrfach verdünnt). Differenzieren, wenn nötig, mit saurem Alkohol.

Bei Doppelfärbung dient das Kernschwarz als Plasmafarbstoff. Man muß es daher konzentrierter anwenden, um das Plasma genügend zu färben. Die Schnitte werden darauf in Wasser abgewaschen und kommen dann in eine spez. Kernfarbe.

Metallimprägnationen.

In gefärbten Präparaten sitzt die Farbe in der Gewebsfaser entweder chemisch oder durch Adsorption gebunden, vielleicht auch in fester Lösung, oder sie ist als Lack durch eine Beize darin niedergeschlagen. Dagegen wird bei den Imprägnierungen die Substanz, die einzelne Gewebselemente hervorhebt, als feinkörniges Präzipitat angetroffen. Die meisten in der mikroskopischen Technik gebrauchten Imprägnierungen beruhen auf der Reduktion von Metallsalzen und ihrer Beeinflussung durch Licht; doch liegt die Sache nicht einfach so, daß in dem Präzipitat das Metall selbst vorläge; auch treten neben ausgesprochen körnigen Imprägnationen Färbungen bei der Behandlung mit Metallsalzen auf, bei Goldmethoden treten diese sogar in den Vordergrund. Bei Silber kann der

primären „negativen“ Imprägnierung der Interzellularräume durch Reduktion eine nachträgliche Lösung des Präzipitates und damit weiter eine dadurch bedingte „positive“ Färbung („Imprägnation“) folgen. Im Gegensatz zu den Färbungen versprechen die Imprägnierungen nur dann oder wenigstens dann die besten Resultate, wenn sie auf frische oder eben erst fixierte Gewebe angewendet werden. Oft bringt man das noch lebende frische Gewebe direkt in das Metallsalz, das in diesem Falle gleichzeitig die Fixierung besorgt.

Imprägnation mit Silber.

Zur Herstellung von Silberimprägnationen wird fast immer Silbernitrat (Höllenstein) angewendet, nur sehr selten andere Silbersalze wie Silberpikrat, — citrat, — lactat oder — acetat (im Verhältnis 1: 800 in Wasser mit 10—15 Tropfen der betreffenden Säure) oder eine Protargollösung (oder 1% Protargollösung mit derselben Menge 1% Osmiumsäure).

Silbernitrat bildet ungefärbte Kristalle oder weiße Stäbchen, die zur Verhütung einer Reduktion staubfrei in gutschließenden dunklen Flaschen aufbewahrt werden. Es wirkt bekanntlich stark ätzend auf die Haut, die sich nachher schwärzt.

Zur Imprägnierung der Kornea wird es in fester Form angewendet; man fährt mit einem Kristall schnell über die Hornhaut, die dann lospräpariert, in dest. Wasser gebracht, durch Reiben mit einem Pinsel vom Epithel befreit und schließlich in dem destillierten Wasser dem Licht ausgesetzt wird.

Gewöhnlich aber bedient man sich des Silbernitrats in Lösungen, und zwar einer 1%igen in dest. Wasser (eventl. mit 3% HNO_3), die man je nach dem Objekt noch 2—10 mal verdünnen kann (z. B. für Injektionen in Gefäße). Man kann das Silbernitrat auch mit anderen Fixierungsmitteln mischen, so z. B. 5 Vol. 1% $AgNo_3$ mit 4 Vol. Osmiumsäure von 1% und 16 Vol. konz. wässriger Pikrinsäurelösung. Die frischen

Objekte werden zuerst mit destilliertem Wasser gründlich abgespült, um Blut, Serum usw. gut zu entfernen, bei Seetieren muß wegen der Menge von Chloriden, die sich mit dem Silbersalz umsetzen, besonders sorgfältig mit dest. Wasser (eventl. nach Anfixierung mit Osmiumsäure) oder mit etwa 3—1,3 $^0/_0$iger Lösung von Salpeter (oder 4 ½ %iger Glaubersalz) gewaschen werden.

Handelt es sich um Membranen, deren Epithelien hervorgehoben werden sollen, so spannt man dieselben mit Igel- oder Kaktusstacheln auf einen Kork, Holundermark oder auf einem Wachsrähmchen auf oder klemmt sie zwischen Kautschukringe (Hoggansche Ringe).

Das Objekt wird in der Silbernitratlösung oder nach Übertragung in destilliertes Wasser (eventl. mit 3% HNO_3) dem Licht ausgesetzt, das möglichst allseitig einwirken soll. Man kann z. B. das Glasschälchen mit dem Objekt auf den Tisch eines Präpariermikroskopes legen und nun auch von unten mit dem Hohlspiegel durchleuchten. Gewöhnlich werden natürlich nur so dünne Membranen oder so kleine Objekte behandelt, daß sie nachher gleich eingeschlossen werden können. Zur Verhütung von Präzipitaten ist es vorteilhaft, das Objekt etwas zu bewegen. Im Sonnenlicht ist die Imprägnation meist in wenigen Minuten fertig, bei diffusem Licht muß man meist länger warten; doch ist die Zeit je nach dem Objekt sehr verschieden. Die Objekte werden erst durch die Fixierung weißlich, dann gibt der Beginn des Schwärzlichgrauwerdens gewöhnlich den richtigen Zeitpunkt zum Unterbrechen der Belichtung. Membranen kommen dann noch im aufgespannten Zustande in Alkohol zur Härtung. Später wird in üblicher Weise in Balsam oder sonstwie eingeschlossen. Nach gelungener negativer Imprägnation lassen sich die Präparate noch etwas mit Karmin oder Hämatoxylin usw. nachfärben, so daß die Kerne, die vom Silber ganz frei sein sollen, hervortreten. Ist dagegen bei zu schwacher Silberlösung und zu wenig intensiver Beleuchtung, kurz

bei ungenügender Reduktion ein positives Bild entstanden, so sind die Kerne schon gefärbt und nehmen keinen Farbstoff mehr an.

Man hat die Sicherheit und Schnelligkeit der Imprägnation vielfach dadurch zu steigern versucht, daß man statt in destilliertem Wasser in einer schwachen Lösung eines Reduktionsmittels exponiert, z. B. in 2 %iger Essigsäure, in Ameisensäure (kann z. B. mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, dem doppelten Volumen der 1 % Silbernitratlösung direkt beigegeben werden). Ferner in Zinnchlorid (¼—½ % für 2—3 Minuten) Hydrochinon, Kaliumpermanganat, Amylalkohol (1 % und 1 % Ameisensäure in H_2O) Glyzerin oder Glyzerin mit Alkohol usw.

Um das Nachdunkeln zu verhüten, kann man nach der Reduktion (wenige Sekunden) in Fixiersalzlösung (Natriumsulfitlösung 2 %) gehen.

Gute Imprägnationen erhält man auch mit sogenannter ammoniakalischer Silberlösung, die man sich herstellt, indem man etwa zu 10 % Silbernitratlösung soviel 40 % Ammoniak tropfenweise zufügt, bis sich der anfangs gebildete Niederschlag eben wieder löst, und dann so stark verdünnt, bis nur noch ¾—½ % Ag in der Lösung ist.

Golgische Methode. Die Golgische Methode beruht auf der Bildung eines Präzipitates von unbekannter chemischer Natur nach Vorbehandlung frischer Objekte mit Kaliumbichromat und Nachbehandlung mit Silbernitrat oder Sublimat. Der Niederschlag entsteht vorzugsweise auf Zellen und Fasern des zentralen und peripheren Nervensystems, aber auch auf Gliaelementen, Bindegeweben, Sekretkapillaren, Tracheen und Gefäßen. Dabei werden niemals alle Elemente durch die Imprägnation hervorgehoben, sondern immer nur einige, diese aber vollständig, eine Nervenzelle also mit allen ihren Fortsätzen, Dendriten, Kollateralen usw. Diese launige Eigenschaft der Golgimethode, die uns nie alles zeigt, was vorhanden ist, und uns immer zwingt, eine ganze Reihe von

Präparaten zu machen, ist andererseits insofern ein großer Vorteil, als dadurch aus dem unübersehbaren Gewirr nervöser Elemente einzelne mit Klarheit hervorgehoben werden. Natürlich sind Golgi-Präparate immer mit Vorsicht und Kritik zu deuten — auch deshalb, weil sich unabhängig von Gewebselementen Niederschläge bilden können. Die Methode wird in verschiedenen Modifikationen gebraucht.

1. die langsame Methode. Man bringt kleine Stücke (1—2 cm Seitenlänge) frischen Gewebes in Müllersche Flüssigkeit oder aber einfach in 2% Kaliumbichromat, wechselt die Lösung häufig und verstärkt sie dabei nach und nach bis ungefähr 5%. Im Sommer müssen die Stücke 30—40 Tage, im Winter 3—4 Monate oder länger in der Lösung bleiben. Bei 20—25° im Thermostaten braucht man weniger Zeit, das Resultat ist aber weniger gut, ebenso wie bei der Anwendung von Erlicki's Gemisch (2,5 g Kaliumbichromat und 0,5 g Cuprum sulfuricum auf 100 ccm Wasser), das aber in Mischung mit Müllerscher Flüssigkeit (1 : 1 bis 1 : 4, allmählich steigend) gute Resultate gibt. — Bei größeren Stücken muß man die gewählte Lösung (etwa 2,5% $K_2Cr_2O_7$) in die Gefäße injizieren.

Nach der angegebenen Zeit macht man in Pausen von einigen Tagen Probepräparate, bis man den günstigsten Zeitpunkt gefunden hat. Aus der Bichromatlösung kommt nämlich das Objekt direkt in 1%ige (oder 0,5—0,75%) Lösung von Silbernitrat; man kann erst in einer früher gebrauchten alten oder einer verdünnten Silberlösung abspülen und muß auch später die Silberlösung wechseln, wenn sie gelb geworden ist. In ein bis zwei Tagen ist die Reaktion beendigt, längeres Verweilen schadet aber nicht und ist, wenn man Zeit braucht, angebracht, da die Präparate in Alkohol verderben. Bei kurzer Härtung in schwachem Bichromat ist schwache Silberlösung, bei langer oder starker Härtung auch konzentriertere Silberlösung zu empfehlen. — Über Weiterbehandlung siehe unten.

2. Die schnelle Silbermethode ist bedeutend kürzer und wird daher meist angewendet, obwohl ihre Erfolge diejenigen der langsamen Methode zum mindesten nicht übertreffen. Die Härtungsflüssigkeit besteht hier aus 2 Teilen 3%iger Kaliumbichromatlösung und 1 Teil 1%iger Osmiumsäure. Die Objekte müssen kleiner sein (1—0,5 cm Kantenlänge) und geben vom 2.—10. Tag Reaktionen; am besten pflegen die Proben vom 3.—7. Tag zu sein. Auch hier ist in der Silberlösung, die nicht erschöpft sein darf, aufzubewahren.

3. Die gemischte Silbermethode besteht in einer Kombination der vorhergehenden. Man legt erst in Müllersche Flüssigkeit oder in Kaliumbrichromat ein und kann durch Überführen einzelner Stücke in die Osmiummischung der zweiten Methode jederzeit nach 3—8 Tagen Präparate fertig haben. Diese Methode ist wegen ihrer Feinheit und Bequemlichkeit bei Bearbeitung eines großen Materiales sehr zu empfehlen.

Auch für Ciliendarstellung bei Infusorien ist die Golgimethode zu gebrauchen. Man fixiert im Kaliumbichromat Osmiumgemisch nach der schnellen Methode und spritzt dann die Infusorien mit einer Pipette und möglichst wenig Bichromat erst in eine verdünnte und dann in die 1% Silberlösung. Nachher wird schnell entwässert und in Balsam unters Deckglas gebracht.

Weiterbehandlung des Golgimaterials. Die imprägnierten Blöcke kommen möglichst kurz in 50 dann 95%iger und absoluten Alkohol (im ganzen nur ½—2 Stunden) und werden dann in ganz abgekürzter Weise in Zelloidin (½ Stunde in dünnem Gemisch) oder Paraffin eingeschlossen. Man braucht eigentlich nur für eine Einhüllung nicht aber für richtige Durchtränkung zu sorgen, da die Schnitte, um gute Übersichten zu gewähren, doch 40—60 $\mu\mu$ dick sein sollen. Man kann auch sehr gut mit dem Gefriermikrotom schneiden (wobei zuviel Wasser zu vermeiden ist); sehr häufig braucht man überhaupt keinen Einschluß und kann z. B.

das schön gehärtete Osmiummaterial leicht zwischen Holundermark oder Leber mit dem Rasiermesser schneiden. Die durch Kreosot oder Xylol entwässerten Schnitte kommen dann in Dammar oder Kanadabalsam auf den Objektträger und müssen mit reichlich überfließendem Balsam bedeckt ohne Deckglas bleiben. Unter dem Deckglas verderben die Präparate vielleicht wegen des Wassergehaltes. Doch gelingt es durch vorsichtiges Erhitzen der Präparate alles Wasser zu entfernen und nun die völlig trockenen Harzstellen noch mit dem Deckglas zu bedecken. Man kann die Präparate, die nicht bedeckt werden sollen, auch auf Deckgläser auflegen, dann trocknen lassen und umgekehrt in ein Rähmchen wie ein hängender Tropfen montieren. Dann stört die unregelmäßige Oberfläche der freien Balsamschicht weniger.

Statt des Kaliumsalzes kann man bei der Golgi-Methode auch das leicht eindringende Natriumsalz, das zu einer bevorzugten Imprägnierung der Tangentialfasern des Nervensystems führende Ca-Salz und das auch sehr gute Resultate gebende Rb-Salz nehmen. Statt Silbernitrat wird auch 0,75% Silbernitrit in $^1/_{10}$% Ameisensäurelösung oder auch organische Silberverbindungen genommen.

Nach Cajal kann man unvollkommen imprägniertes Material aus der Silberlösung wieder in das Osmiumgemisch oder in 20 ccm 3,5% Bichromat mit 2—3 ccm 1% Osmiumsäure bringen, es dort etwa 1—2 Tage lassen, wieder für mehrere Tage in die Silberlösung bringen und diese Prozedur bei nicht genügendem Resultat noch einmal wiederholen.

Objekte, die so lange im Osmiumgemisch waren, daß sie keine Reaktion mehr ergeben, kann man auf 8 Stunden bis 10 Tage in ein Gemisch von gleichen Volumina 4—5%iger Kupfersulfatlösung und 2—3%igem Bichromat und dann von neuem in Silbernitrat bringen.

Statt in ein Osmiumbichromatgemisch kann man die frischen Objekte auch in eine vor dem Gebrauch herzustellende

Mischung von 40 ccm 3,5 %igem Kaliumbichromat mit 10 ccm Formol einlegen und nach einem Tag noch 1—5 Tage in 3,5 %ige reine Bichromatlösung bringen. Diese Methode eignet sich besonders für das Zentralnervensystem.

Zur Vermeidung starker Niederschläge auf den Objekten kann man sie vor dem Einlegen in die Silberlösung in ein Papierkästchen mit schwach erwärmter 10 %iger Gelatine bringen. Dann kommen sie mit dem Mantel in das Bad. Die Gelatine wird nachher in warmer gesättigter Lösung von doppeltchromsaurem Silber wieder abgewaschen (vor dem Einbetten!).

Um die Präparate haltbar zu machen, verwandelt Obregia das Silbersalz (oder Quecksilbersalz) in ein Goldsalz dadurch, daß er die Schnitte in Alkohol abs. mit 8—10 Tropfen 1 % iger Goldchloridlösung pro 10 ccm (½ Stunde vorher in diffusem Licht ansetzen!) bringt und gleich ins Dunkle (15 — 30 Minuten) stellt, dann schnell in 50 %igem Alkohol auswäscht, mit dest. Wasser nachspült und in 10 %iger Lösung von Fixiersalz 5—10 Minuten verweilen läßt. Dann kann gut gewaschen, beliebig nachgefärbt und in Balsam mit Deckglas eingeschlossen werden. — Auch durch Chlorieren und Bromieren und nachträgliche Belichtung kann man die Präparate in eine unveränderliche Form überführen. — Kallius reduziert das Silbersalz der Schnitte in einem Entwickler (40—60 ccm Alkohol abs. und 125 ccm Wasser mit 10 ccm von der Lösung: Hydrochinon 5 g, Natrium sulfurosum 40 g, Kalium karbonikum 75 g und 750 ccm Wasser), was in mehreren Minuten erreicht zu sein pflegt. Dann werden die grauschwarz gewordenen Schnitte 10—15 Minuten in 70 % Alkohol gewaschen und 5 Minuten in eine 20 % Lösung von Fixiersalz gebracht. Endlich kann bis 24 Stunden in destilliertem Wasser gewaschen und dann in beliebiger Weise nachgefärbt und eingeschlossen werden.

Golgis und Cox' Sublimatmethode. Die Verwendung von 0,25—1 % Sublimatlösung in destilliertem

Wasser an Stelle des Silbernitrates gibt sichere Resultate, verlangt nicht so genaues Halten an Konzentration und Zeit und gestattet größere Stücke, ja bei guter Injizierung ganze Gehirne zu nehmen. Die Imprägnierung sieht im auffallenden Licht weiß und metallisch glänzend aus, im durchfallenden Licht erscheint sie schwarz. Man härtet in 1—3 %iger Kaliumbichromat mit oder ohne Konzentrationssteigerung oder in Müllerscher Flüssigkeit 2, 3—4 Monate lang, überträgt direkt in die Sublimatlösung, in der das Objekt 8—10 Tage, ganze Gehirne aber erheblich länger verweilen müssen. Dauerte das erste Bad länger, so muß auch der Zeit für das zweite zugesetzt werden. Das Quecksilberbad ist zuerst täglich, später beim Gelbwerden zu erneuern. Die Objekte können bis zur Behandlung in ihm aufgehoben werden. Die Schnitte werden vor dem Einschluß in Glyzerin oder Balsam, bei dem ein Deckglas zulässig ist, gründlich gewaschen. Die Schnitte können nach Obregia vergoldet, in Fixiersalz geschwärzt oder mit einem komplizierten Tonfixierbad nach Golgi weiterbehandelt und dann beliebig nachgefärbt werden.

Cox bringt die Objekte, die die Größe eines halben Rattengehirns nicht überschreiten sollen, gleich in folgende Bichromat- und Sublimatmischung: 5 %iges Kaliumbichromat 5 Teile, 5 %iges Sublimat 5 Teile, 5 %iges Kaliumchromat 4 Teile, die vor dem Mischen mit dem übrigen noch durch 8—10 Teile Wasser verdünnt werden. Nach ein bis mehrmonatlichem Aufenthalt in der Lösung wird auf dem Gefriermikrotom (langsames Einbetten schadet!) geschnitten, dann 1—2 Stunden in 5 % Natriumkarbonatlösung gelegt, in der der Niederschlag schwarz wird. Endlich wird in Wasser gewaschen und durch Alkohol und ein Öl in folgenden Lack gebracht: Sandarak 75 Vol., Kampfer 15 Vol., Terpentinöl 30 Vol., Lavendelöl 22,5 Vol., Alkohol abs. 75 Vol., Ol. Rizini 5—10 Tropfen. Zunächst kann kein Deckglas aufgelegt werden. Nach völligem Trockenwerden des Lackes aber schadet es nicht mehr,

wenn man erst einen Tropfen Rizinusöl zugibt und diesen mit dem Deckglas wieder großenteils wegpreßt.

Kronthals Methode mit ameisensaurem Blei. Frische oder vorher in 10%igem Formol fixierte (bis zu 2 Jahre alte) Objekte von höchstens 8 mm Kantenlänge werden in ein Gemisch gleicher Teile 10%iger Formollösung und gesättigter wässriger Lösung von Plumbum formicicum für 5 Tage gelegt und dann in eine Mischung gleicher Teile von 10%igem Formollösung und Schwefelwasserstoffwasser gebracht. Man kann das Stück vorher mit etwas von der letztgenannten Lösung übergießen. Nach 5 Tagen wird durch Alkohol geführt und oberflächlich in Zelloidin eingeschlossen, dann die Schnitte durch Karbolxylol entwässert und in Xylolbalsam unter das Deckglas gebracht. Nach der Kronthalschen Methode erhält man viel mehr Elemente geschwärzt als nach der Golgischen.

Silbermethoden zur Darstellung der Neurofibrillen nach Cajal und Bielschowsky. Bei den verschiedenen Methoden Cajals wird immer das Silbernitrat durch Hydrochinon oder Pyrogallussäure reduziert. Vorbehandelt werden die frischen Objekte (3—4 mm Dicke) entweder direkt in ½—6, meist 1,5%igem Silbernitrat im Dunkeln bei 35—40° oder aber erst 24 Stunden in 40%igem Alkohol (eventl. mit 6—16 Tropfen Ammoniak auf 100 ccm) und nach kurzem Abspülen in dest. Wasser in 1,5% Silbernitratlösung im Dunkeln bei 35—38° für 4—5 Tage. Auch kann man in einer Lösung von 25 ccm Formol in 100 ccm Wasser mit mehreren Tropfen (bis 1 ccm, Ammoniak fixieren und nach 6—12 stündigem Waschen in die Silberlösung gehen.

Nach dem Silberbad wird kurz in destilliertem Wasser gewaschen, und in die Reduktionsflüssigkeit: 16 g Pyrogallussäure oder Hydrochinon, 5—15 ccm Formol auf 100 ccm dest. Wasser gebracht. Nach 24 Stunden wird gewaschen und dann in gewöhnlicher Weise in Paraffin oder Zelloidin

eingebettet, geschnitten usw. Nur die Mittelzone wird gut. Zu langes Verweilen in der Silberlösung schadet; man kann also mit Vorteil auch hier vom 3. bis 8. Tag Proben nehmen.

Bielschowsky fixiert kleine Stücke in 12 %igem Formol, wäscht sie in dest. Wasser gut aus und bringt sie für 1—8 Tage in 2 %ige Silbernitratlösung und zwar im Dunkeln. Darauf wird kurz in dest. Wasser gewaschen, und für ½—6 Stunden in ammoniakalische Silberlösung übergeführt. Dann kommt das Objekt kurz in Wasser und weiter in 20 %iges Formol in Leitungswasser, wo es 12 Stunden bis mehrere Tage bleibt. Endlich wird schnell in Paraffin oder Zelloidin eingebettet. Zur Fixierung des Silberbildes kommen die mit Eiweiß aufgeklebten Schnitte für 5—10 Minuten in mit Essigsäure schwach angesäuerte 0,02—0,03 %ige Goldchloridlösung und nach Abspülung weiter in ein saures Fixierbad (5 % Natriumhyposulfit mit Zusatz von saurem schwefligsaurem Natron). Nach einer Fixierung von 5—15 Minuten wird wiederum gespült, und dann durch Karbolxylol in Kanadabalsam eingeschlossen. Bei gelungener Imprägnation sind die Neurofibrillen geschwärzt, anderenfalls treten die Kerne und das Tigroid hervor.

Imprägnierungen und Färbungen mit Gold.

Negative Imprägnationen liefert das Gold fast nur, wenn man es in mit Silber imprägnierten Membranen an dessen Stelle treten läßt. Man bringt zu dem Zweck die Präparate nach der Reduktion des Silbers für einige Minuten in ½ %iges Goldchlorid und läßt in angesäuertem Wasser nochmals reduzieren.

Sonst liefert die mikroskopische Anwendung von Goldmethoden fast immer positive Bilder. Allerdings ist das Resultat bei Vorvergoldung, d. h. bei Einwirkung des Goldes auf die frischen Gewebe sehr verschieden von dem der „Nachvergoldung“ bereits fixierter Gewebe. Bei letzterer resultiert eine starke Färbung von Kernen, eine lebhafte Rotfärbung

der Muskel- und eine Schwärzung der Nervenfibrillen, während das Plasma ziemlich wenig gefärbt wird. Bei der Vorvergoldung ist umgekehrt das Plasma stark gefärbt, während Kerne, Muskelfibrillen usw. kaum oder weniger hervortreten.

Als Goldsalz wird fast immer das Aurum chloratum benutzt, das als „fuscum" und als Au. chl. „flavum" im Handel ist, ersteres enthält 53, letzteres 48 % Goldchlorid. Außerdem sind Wasser und Salzsäure vorhanden. Kochsalz soll dagegen fehlen (von Grübler und Hollborn zu beziehen). Auch sogenanntes kolloidales Gold ist angewendet worden.

1. Vorvergoldung. Die Reduktion wird fast immer in verdünnter Essigsäure oder Ameisensäure vorgenommen. Apathy gibt folgende Vorschrift: Das frische Objekt (einige Zeit tote oder gar in Drittel-Alkohol macerierte Objekte können auch noch Resultate geben) kommt im Dunkeln auf 2—24 Stunden in 1 %iges Goldchlorid (keine Metallinstrumente benutzen!); um der Schrumpfung vorzubeugen, werden Membranen aufgespannt. Dann werden sie auf 6—8 Stunden oder länger in 1 %ige Ameisensäure gebracht und möglichst von allen Seiten belichtet. Das Objekt wird möglichst wenig bewegt, um eine Ausschwemmung der Färbung zu verhüten, worauf besonders bei Erneuerung der Ameisensäure, die beim Dunkelwerden vorgenommen werden muß, zu achten ist. Nachher wird in Glyzerin, einem Zuckersirup oder Balsam eingeschlossen.

Viallanes bringt die Objekte bis zum Beginn der Bräunung in 1 %ige Osmiumsäure, dann auf 10 Minuten in 25 %ige Ameisensäure, weiter in eine sehr schwache (0,02 % oder weniger) Goldchloridlösung und läßt sie im Dunkeln 24 Stunden darin. Endlich wird am Licht in 25 %iger Ameisensäure reduziert.

Nachvergoldung. Zur Nachvergoldung wird entweder wie bei der Golgimethode in etwa 2 % Ammonium- oder Kaliumbichromat fixiert oder aber man verfährt nach der meist angewendeten Apathyschen Methode:

Fixiert wird in konzentrierter Lösung von Sublimat in ½% Kochsalzlösung (größere Stücke 8—12, Membranen usw. 2—2½ Stunden) oder in ein Gemisch dieser Lösung mit derselben Menge Alkohol abs. (doppelt solange), oder mit derselben Menge 1% Osmiumsäure (letzteres besonders für Wirbeltiere, wobei Bräunung durch Lichtabschluß bis zur Einbettung vermieden werden muß). Dann schwenkt man in dest. Wasser gründlich ab und bringt in Jodjodkaliumlösung (1% KJ und ½% J) in Wasser 6—8 Stunden. Bei kleinen Objekten kann diese Prozedur zur Entfernung des Sublimats genügen; bei größeren muß in entsprechender Jod-Mischung in 96% Alkohol weiter ausgewaschen werden. Jedenfalls aber wird das Objekt aus dem Wasser direkt in 96% Alkohol gebracht, weil längeres Verweilen in Alkohol schadet und die Entwässerung möglichst schnell vollzogen werden muß. Dann folgt absoluter Alkohol und Einbettung in Paraffin durch Chloroform (nicht Xylol usw.!) oder in Zelloidin. Schnittdicken von 7½—10 μ sind am empfehlenswertesten. Die Schnitte werden schnell in dest. Wasser übergeführt und bleiben 2—6 Stunden darin. Oder man spült sie nur leicht in dest. Wasser, taucht sie dann 1 Minute in 1% Ameisensäure, spült wieder mit dest. Wasser und bringt sie dann auf 24 Stunden (mindestens über Nacht in die 1% Goldchloridlösung) ins Dunkle. Dann kommen sie direkt in 1% Ameisensäure zum Reduzieren. Auswaschen darf man sie vorher nicht, höchstens einmal schnell in destilliertes Wasser eintauchen, um die äußerlich anhaftende Goldlösung zu beseitigen. Dies läßt sich aber auch in hinreichender Weise durch Abputzen des Objektträgers (nicht der Schnitte!) mit Fließpapier erreichen. In der Ameisensäure werden die Objektträger so gestellt, daß sie etwas schräg stehen und die mit Schnitten belegte Seite nach unten kehren, so daß das reduzierte Gold sich senken kann, ohne die benachbarten Schnitte zu verunreinigen. In jedem Glaszylinder soll nur ein Objektträger stehen. Die Reduktion hat im Licht aber bei

kühler, 20° jedenfalls nicht überschreitender Temperatur zu geschehen, doch soll das Licht von allen Seiten gut die Schnitte erreichen können. Sonnenschein ist wenigstens im Sommer durchaus nicht erforderlich. Nach 6—8 höchstens 24 Stunden ist die Reduktion, bei der die Schnitte nicht allzuviel bewegt werden sollen, beendigt und es kann dann gründlich ausgewaschen, nachgefärbt z. B. mit einem Kernfärbungsmittel und in Glyzerin, in einem Zuckersirup oder in Balsam eingeschlossen werden.

Osmiumsäure.

Kleine Tiere, Larven, pelagische Organismen usw. werden häufig mit 0,05—0,1% Lösung von Osmiumsäure fixiert, weil dabei gleichzeitig eine Bräunung entsteht, die zuweilen Teile des Nervensystems schön hervorhebt und überhaupt eine Färbung überflüssig macht. Fixationsgemische, die Osmiumsäure enthalten, wie das Flemmingsche oder Hermannsche, ergeben dasselbe Resultat.

Die Bräunung beruht auf einer Reduktion, sie wird vom Licht beeinflußt, kann aber hier ebenso wie bei den Gold- und Silbermethoden durch reduzierende Agentien verstärkt werden.

Man fixiert also in Flemmings oder Hermanns Gemisch je nach der Größe der Stücke ½ Stunde bis zwei Tage, und zwar, um eine Reduktion vor dem Eindringen zu verhindern, im Dunkeln und überträgt die Objekte dann direkt in eine schwache Lösung von Pyrogallussäure (Lee), die wiederum je nach der Größe des Objekts eine halbe Stunde bis einen Tag lang einwirken muß. Dann wird eingebettet und geschnitten und eventl. mit einem nach Osmiumsäure möglichen Farbstoff nachgefärbt (Safranin usw.). Doch ergibt die Methode an sich eine gute grauschwarze Kern- und Plasmafärbung.

Statt in Pyrogallussäure kann man auch in konzentriertem oder verdünntem alten „schmierigen" Holzessig nachbehandeln; auch dann resultiert eine ähnliche Bräunung,

die aber vielleicht auf einer einfachen Färbung mit Stoffen aus dem rohen Holzessig beruht, der auch nach Alkohol oder Sublimatfixierung ähnliche Resultate gibt. (Hermann, Mährenthal.)

Bei Nachbehandlung mit Oxalsäure (im Verhältnis 1 : 15 in Wasser gelöst) für 24 Stunden erhält man rote Präparate.

Man kann auch nach Fixierung mit anderen Mitteln noch 1% Osmiumsäure einwirken lassen und nachher reduzieren. Die Präparate werden oliv-grünlich-braun. Auch dann können sich z. B. nach vorheriger Stückfärbung in Boraxkarmin sehr gute Wirkungen erzielen lassen.

Herstellung von Dünnschliffen organischer Hartteile.

Die genauere Untersuchung der Struktur organischer Hartgebilde ist wegen der allgemeinen Bedingungen der üblichen mikroskopischen Beobachtungsweise im durchfallenden Licht ebenso auf die Herstellung dünner durchsichtiger Platten aus dem Objekt angewiesen wie die Untersuchung der Weichteile auf die Anfertigung von Schnitten. Bei Skeletteilen, Zähnen und dergleichen könnte man allenfalls die Technik der Metallmikroskopie heranziehen und mit dem Vertikalilluminator beobachten. Aber auch dann müßte wenigstens die zur Beobachtung ausgewählte Fläche geschliffen werden. Da aber so gut wie alle organische Hartteile in dünner Schicht gut durchsichtig werden, so ist es fast immer vorteilhaft, Dünnschliffe herzustellen, die die günstigere Beobachtungsweise im durchfallenden Licht gestatten.

I. Allgemeine Methode des Schleifens.

Schliffe von kompakten Stücken.

Da es zu mühsam und zeitraubend sein würde, alle überflüssige Substanz eines größeren Skelettstückes bis auf die dünne gewünschte Schliffplatte durch Schleifen zu entfernen,

so sägt man aus Objekten, die senkrecht zu der gewünschten Schliffebne dicker als 2 mm sind, eine Platte von 2 mm oder geringerer Dicke heraus, um diese dann erst zu schleifen. Zum Heraussägen bedient man sich feiner festgespannter Laubsägen. Das Objekt kann man entweder mit der Hand halten oder irgendwie zwischen Kork einspannen. Zuweilen ist es vorteilhaft den ganzen Laubsägebogen in einen Schraubstock einzuspannen und nun das Objekt auf der Säge hin und herzuführen. Kleine feine rotierende Kreissägen eignen sich ebenfalls zum Aussägen der Platten. Für ganz harte Substanzen, wie Zahnschmelz, kann man sich der Korund-, Karborund- oder Diamanträder der Zahnärzte bedienen.

Das Aussägen kann man in vielen Fällen auch durch Abfeilen mit oder auf einer Feile oder durch Abschleifen auf ganz groben Schleifsteinen ersetzen. Das Allergröbste kann an einem großen drehbaren Schleifstein (für Messer, Beitel, Werkzeuge) entfernt werden. Jedenfalls sollte man sich für das erste grobe Anschleifen, wie es auch nach dem Aussägen meist noch notwendig ist, einen Sandstein in der Größe von zwei bis drei Handflächen halten. Auf derartigen Steinen kann trocken oder in Wasser geschliffen werden. Das Objekt wird mit den Fingern gehalten oder mit einem Kork angedrückt, auch kann man es mit etwas Siegellack oder mit durch Wärme verflüssigtem hartem Kanadabalsam an ein passendes Stück Kork oder Holz ankitten, von dem es später durch Lösen des Siegellackes in Alkohol oder des Balsams in Chloroform, Benzol oder dergl. wieder entfernt werden kann. Das grobe Anschleifen kann man auch ausführen nach der von den Mineralogen und Glasschleifern meist angewendeten Methode des Schleifens auf einer rotierenden oder feststehenden Gußeisenscheibe mit Benutzung von Karborund oder geschlämmtem Schmirgel zum Schleifen, das meist mit Wasserzusatz geschieht. Man kann bei dieser Methode die Glätte der angeschliffenen Fläche immer weiter durch Anwendung immer feinerer Schleifmittel steigern, von

denen man nach Karborund und Schmirgel noch Zinnasche, Englischrot oder das besonders empfehlenswerte Diamantin (durch Glühen von Ammoniumalaun hergestellte Tonerde) benutzen muß. Man geht bei der allmählichen Verfeinerung der Schliffläche von der Gußstahlscheibe auf eine glatte Mattglas- und schließlich auf eine vollkommen ebene Spiegelglasscheibe über. Für einige Zwecke werden auch Schmirgelpapiere von verschiedenem Korn benutzt.

Diese Prozedur allmählicher Verfeinerung der Schliffläche ist aber für unsere Zwecke nur dann anwendbar, wenn das zu schleifende Skelettstück kompakt, also ohne Hohlräume, Kanäle und dergleichen ist. Anderenfalls setzt sich nämlich das Schleifmittel gewöhnlich in den Kanälen so fest, daß es meist nicht mehr vollkommen entfernt werden kann.

Beim Schleifen organischer Skelettstücke begnügt man sich daher gewöhnlich mit der späteren Anwendung feinerer Steine. Nach der Behandlung auf dem Sandstein (oder bei kleineren Objekten direkt) geht man zum Schleifen auf sogenannten Abziehsteinen (für Rasiermesser) über. Recht empfehlenswert sind die überall käuflichen etwa handgroßen Rubinitsteine, die in drei Härte- bezw. Feinheitsgraden hergestellt werden. Noch etwas zarter sind die gelbweißen Abziehsteine aus Lithographiestein (Arkansas-Ölsteine oder gelbe belgische für Öl oder Seifenwasser), man kann zum Schluß auch noch auf einer feinen Mattglas- und endlich auf einer Spiegelglasscheibe nachschleifen; oft ist das aber nicht mehr notwendig. Leder, Tuch oder Papier sollten zum Polieren nicht benutzt werden; sie ergeben alle keine ebenen Oberflächen.

Auf den Abziehsteinen, sei es nun Rubinit, Marmor oder Lithographiestein, kann entweder trocken, mit Wasser (z. B. auf den blaugrünen Arkansassteinen), Seifenwasser (von Palmölseife) oder aber mit einem Öl geschliffen werden. Von Ölen werden Erdnußöl und das bei Glasbohrungen usw. viel

gebrauchte, Terpentinöl empfohlen, auch Cedernöl eignet sich vortrefflich. Das Schleifen in Ölen wirkt erheblich zarter als Trockenschleifen und Wasseranfeuchtung. Die beim Schleifen von Objekt und Stein abgerissenen Partikelchen können in dem schmierigen Öl leichter ausweichen und stören dann den gleichmäßigen Schliff der Steinfläche weniger. Trotzdem muß man immer nach einigen Minuten — wenigstens bei der letzten Politur — das Öl mit dem in ihm enthaltenen Schleifstaub entfernen (ev. mit einem in Xylol oder Chloroform getauchten Lappen nachputzen) und durch neues ersetzen.

Ist an dem Objekt bezw. an der ausgesägten Platte eine Seite definitiv fertig geschliffen und poliert, so wird der Hartteil nun mit dieser Fläche auf die ebene Seite irgend eines handlichen, sauberen und beim Schleifen nicht schmutzenden Trägers befestigt. Die Mineralogen gebrauchen zuweilen ganz besondere derartige Träger, die gestatten, Flächen in bestimmter Richtung zu einer Ausgangsfläche zu schleifen. Meist dienen jedoch einfache Glasobjektträger (quadratisches, Gießener oder englisches Format) zur Befestigung. Als Verbindungsmittel nimmt man Wachskolophonium (1: 2) oder gebräuchlichen Kanadabalsam (1 Teil), in dem in der Wärme das 3⅓fache Volumen pulverisierten Schellacks gelöst wird. Ganz reine trockene Harze sind zu spröde und können beim Schleifen abspringen, daher der Wachszusatz. Man kommt jedoch auch mit dem gewöhnlichen oder etwas eingedickten Balsam aus. Zum Aufkitten bringen wir einen sehr kleinen Tropfen dicken Balsams oder ein kleines Stückchen der obigen Mischungen auf die Mitte des Objektträgers und erhitzen nun vorsichtig bis das Lösungsmittel (Xylol) nahezu vollständig verdampft ist, der Balsam aber durch die Wärme flüssig gehalten wird (ohne zu kochen und zuviel Gasblasen aufzuweisen). Dann drückt man das Objekt mit der fertig geschliffenen Seite fest auf den Tropfen, so daß derselbe ganz dünn und gleichmäßig ausgedrückt wird und das Schleif-

stück mit dem Objektträger ohne Lücke und Luftblase verbindet. Nach dem Erkalten kann dann mit dem Schliff der anderen Seite begonnen werden, der sich genau parallel zu der ersten Schlifffläche ausführen läßt, weil bei dem Dünnerwerden des Objektes der weit überstehende Objektträger keine große Abweichungen von der Parallelebene gestattet und dieselben auch durch seine Größe leicht verrät.

Die zweite Schlifffläche erfährt dieselbe abgestufte Behandlung vom Gröberen zum Feineren wie die erste Fläche. Ist die gewünschte Dicke und Durchsichtigkeit erreicht, was bei etwa $^1/_{10}$ bis $^1/_{100}$ mm einzutreten pflegt, so wird der Schliff mit Xylol oder Chloroform gut abgespült oder abgepinselt und kann dann auf demselben Objektträger mit Kanadabalsam und Deckglas bedeckt werden. Dies schnelle Montieren des Schliffes ist allerdings nur dann zulässig, wenn derselbe vorher trocken war und etwa in Cedernöl geschliffen wurde. Nach Schleifen in Wasser oder Seifenlösung ist Entwässerung in Alkohol notwendig und dann ist es auch — wenn der Schliff nicht allzu dünn und die Bruchgefahr nicht zu groß ist — gewöhnlich ratsam, den Schliff von dem Objektträger, der Schrammen bekommen haben kann, durch Einlegen in Xylol oder Chloroform bezw. Bepinselung zu lösen und auf einem neuen Objektträger zu montieren. Diese Loslösung ist unumgänglich, wenn es sich nicht um kompakte, sondern um spongiöse mit Hohlräumen versehene Hartteile handelt. Nach der Loslösung kann natürlich ausgiebig gereinigt und beliebig eingeschlossen werden.

II. Das Schleifen spongiöser, mit Hohlräumen oder Kanälchen versehener Hartteile.

Nicht kompakte Hartteile erfordern überhaupt noch einige besondere Maßnahmen. Zunächst ist zu bedenken, daß die organische Substanz, die in den Skeletthohlräumen vorhanden ist, beim Schleifen im allgemeinen verzerrt und zerrissen wird — wenn sie nicht überhaupt schon vorher

durch Austrocknen, schlechte Konservierung usw. ein unnatürliches Aussehen erhalten hat. Es ist daher am besten, diese organische Substanz zu entfernen, wenn nicht gerade ihr Verhältnis zum Skelett Gegenstand besonderen Interesses ist.

1. Die **Beseitigung der organischen Substanz** wird bei Knochen gewöhnlich durch wochen- bis monatelanges Liegen in nicht zu kaltem **Wasser** erreicht. Röhrenknochen müssen vorher zersägt oder geöffnet werden, damit das Mark (durch Ausbürsten unter dem Wasserstrahl) entfernt werden kann. Trocknen der Knochen vor dem Einlegen in Wasser ist zu vermeiden, da die Luft das Eindringen des Wassers in die kleinen Kanäle hindern und damit die Maceration aufhalten würde. Nachher werden die Knochen an einem luftigen, hellen aber nicht sonnigen Orte langsam getrocknet, wobei sie ganz weiß werden müssen. Bleiben sie schmierig gelb, so enthalten sie noch Fett, das ihnen aber durch Einlegen in Benzol oder Xylol bei etwa 40^{0} im Thermostat entzogen werden kann.

Kleinere spongiöse Skeletteile, wie diejenigen der Echinodermen, werden am besten in erwärmter verdünnter **Kalilauge** oder in dem käuflichen **Eau de Javelle** von der organischen Substanz befreit. Kalilauge greift kohlensauren Kalk etwas (allerdings sehr wenig) an. Noch schöner wirkt das auch in seiner Anwendung bequemere Eau de Javelle, das kalt verwendet wird, die Objekte sehr schön bleicht und meist in wenigen Stunden oder noch kürzerer Zeit vollständig reinigt. Nach beendigter Maceration muß in destilliertem Wasser, das man bei Eile noch erwärmen kann, gut ausgewaschen werden.

2. **Einschmelzen spongiöser Teile in Harze. Versteinerungsmethode.** Nach der Entfernung des Macerationsmittels kann wie üblich geschliffen werden. Man erhält dabei aber keine guten Resultate, weil die feinen Balken eines maschigen Skeletteiles beim Schleifen vielfach brechen und weil die Schleifpartikelchen sich gewöhnlich in die feinen Kanäle

nicht kompakter Skeletteile so festsetzen, daß sie später nicht mehr vollkommen daraus zu entfernen sind.

Beiden Gefahren kann man durch Durchtränkung der Skeletteile mit später erhärtenden Massen begegnen, durch die einerseits die Skelettbälkchen gehalten und vor dem Brechen bewahrt werden und die andererseits den Schleifpartikelchen den Weg in die feinen Kanälchen versperren. Als Durchtränkungsmassen eignen sich dicke und später in Alkohol zu härtende Gummilösung, Schellack und Wachskolophonium (1: 10). Zum späteren Herauslösen dient bei Gummi laues Wasser, bei Schellack Alkohol und bei Wachskolophonium erst Terpentilöl und nachher Chloroform. Am meisten wird aber einfacher Kanadabalsam zu diesem als Versteinerungsmethode bezeichneten Verfahren benutzt. Die Skeletteile, aus denen das Macerationsmittel gut ausgewaschen sein muß, kommen gleich in absoluten Alkohol (Schrumpfungsgefahr liegt ja nicht vor) und darauf in Chloroform oder Benzol. Eventuell in den Kanälchen vorhandene Luftblasen werden unter der Luftpumpe entfernt oder durch Kochen in (dem nicht brennenden) Chloroform durch später sich kondensierende Dampfblasen verdrängt. Dann wird in ein flaches Schälchen mit Chloroform- oder Benzolbalsam übertragen und bei etwa 30—40 ° im Thermostaten eingedickt. Chloroform und Benzol verdunsten sehr leicht, so daß die Masse bezw. das eingebettete Objekt schon in wenigen Tagen geschliffen werden kann. Der Balsam darf sich dann mit dem Fingernagel nicht mehr eindrücken lassen. Vor dem Schleifen kann das Objekt von der Hauptmenge des anhaftenden Balsams durch Abkratzen befreit werden. Man kann die Hartteile auch vor dem vollständigen Hartwerden des Balsams schon aus dem umgebenden Harz herausnehmen und dadurch eine schnellere Verdunstung erzielen. Allzufrüh darf das Herausnehmen allerdings nicht geschehen, da sich sonst auf der Objektoberfläche eine schnell erhärtende Kruste bildet, die weitere Verdunstung aus dem Inneren

so stark hindert, daß der Balsam dort zuweilen ganz weich bleibt.

Schneller kommt man zum Ziele, wenn man die mit Chloroform durchtränkten Stücke in einen Kochlöffel mit Chloroform- oder gewöhnlichem Balsam bringt und darin über der Flamme erhitzt. Das Chloroform verdampft dann sehr schnell und die im Inneren des Objektes auftretenden Chloroformdampfblasen werden allmählich durch verdampfenden Balsam verdrängt, der sich nachher kondensiert, so daß alle Blasen verschwinden und alle Hohlräume mit Balsam gefüllt werden. Beim Erkalten wird das Harz steinhart. Noch bevor das eingetreten ist, wird das Objekt aus dem noch flüssigen, aber schon keine Dampfblasen mehr bildenden Balsam mit einer Pinzette herausgenommen und von der Hauptmenge des anhaftenden Harzes befreit. Das Kochen des schon an Chloroform armen Balsams darf nicht zu lange ausgedehnt werden und hat sehr vorsichtig zu erfolgen, weil die dazu notwendige Temperatur leicht so hoch werden kann, daß sich der kohlensaure Kalk in gebrannten Kalk verwandelt, wobei die Skeletteile morsch und opak werden.

Versteinerte spongiöse oder lamellöse Skeletteile können nach der Verharzung wie kompakte Stücke geschliffen werden. Nach dem Schleifen wird der Schliff, wie bemerkt, vom Objektträger durch Einlegen in flache viereckige Schalen mit Chloroform oder durch Abpinseln mit Xylol gelöst und dann durch Verweilen in der Flüssigkeit oder durch Kochen in Chloroform von allem Kanadabalsam befreit. Schleifpartikelchen, die sich in die äußeren Balsamschichten eingedrückt haben sollten, werden damit los und fallen aus dem Schnitt direkt oder beim Bespülen heraus. Hartnäckig festsitzende Teilchen lassen sich meist noch durch starkes Kochen in Chloroform beseitigen, wo sie durch die stürmisch in den Kanälen des Objektes auftretenden Gasblasen mitgerissen werden. Ähnlich wirkt Kochen in Chloroform unter der Luftpumpe, wobei man keine Erhitzung braucht, oder das

stürmische Entweichen von Luft, das eintritt, wenn man aus dem Chloroform entnommene und an Luft etwas ausgetrocknete Stücke nachher unter Chloroform oder dergleichen wieder auspumpt.

3. **Schleifen mit den Weichteilen.** Sollen die Weichteile der Skeletthohlräume zum Studium ihres Verhältnisses zu den Hartteilen mitgeschliffen werden, so ist die Versteinerungsmethode unbedingt indiziert. Da sich die Weichteile in nicht ganz festem Balsam leicht verschieben, so muß der Balsam ganz besonders hart werden. Da beim Kochen starke Zerreißungen in den Weichteilen eintreten würden, so ist aber nur die langsame Durchtränkung mit Balsam anwendbar, bei der man viel Zeit braucht um vollkommene Härte der Füllmasse zu erreichen. Überhaupt hat man bei der Behandlung von Skelettstücken mit den Weichteilen alle die durch diese letzteren bedingten Rücksichten zu nehmen, z. B. bei der Entwässerung zur Vermeidung von Schrumpfungen vorsichtiger vorzugehen usw.

Gewöhnlich ist auch eine **Färbung** notwendig, um die Weichsubstanz bezw. ihre Kerne, Fasern usw. hervorzuheben. Die Färbung hat vor dem Schleifen zu erfolgen, muß also eine Stückfärbung sein. Saure Farbgemische lösen kalkige Skeletteile mehr oder weniger stark und müssen daher vermieden werden. Alaun-Hämatoxylin und Alaunkarmin greifen den Kalk durch den Alaungehalt etwas an, können aber vielfach doch benutzt werden. Besonders zu empfehlen sind Magnesiakarmin und Ammoniakkarmin. Für kleine Objekte sind auch basische Teerfarben in dünner Lösung brauchbar. Die Gefahr der Verschiebung der Weichteile in dünnen Schliffen läßt es meist angebracht erscheinen von einer Loslösung vom Schleifobjektträger abzusehen. Nach sorgfältigem Abpinseln mit Cedernöl oder Xylol wird dann gleich ein Tropfen Kanadabalsam zugefügt und das Deckglas aufgelegt.

Wenn man das Skelettstück mit den Weichteilen in Zelloidin einbettet, in Chloroform härtet und dann mit

Kanadabalsam versteinert, so kann man den Schliff nach dem Schleifen loslösen, den Balsam in Chloroform entfernen und nun den Schliff nachfärben. Das Zelloidin verhindert dann stärkere Desorientierungen der organischen Füllmasse beim Loslösen und Nachfärben.

III. Einige besondere Maßnahmen. Darstellung feiner Kanäle.

Feine Kanäle verschwinden bei der Montierung in Kanadabalsam oft in so hohem Grade, daß sie nur noch mit Schwierigkeit gesehen und demonstriert werden können. Man kann verschiedene Wege einschlagen, um sie deutlicher hervortreten zu lassen.

Eine Methode besteht darin, die Kanäle mit stark (etwa in Fuchsin) **gefärbtem Zelloidin** zu füllen und dieses mit Alkohol oder Chloroform zu härten. Die Schliffe kommen in Äther, dann in die Zelloidinlösung, die man in üblicher Weise eindicken läßt und darauf entweder in Alkohol von etwa 80 % oder direkt in Chloroform härtet. Im ersteren Falle kann man in Gummilaevulose oder Terpentin, in letzterem gleich in Kanadabalsam überführen.

Man kann die Kanäle auch dadurch hervorheben, daß man ihre Wände mit einer **Kruste eingetrockneten Farbstoffen** bedeckt. Man bringt die Schliffe aus einer leicht verdunstenden Flüssigkeit (Äther, Chloroform) in eine kochende konzentrierte alkoholische Lösung eines unschädlichen Teerfarbstoffes (etwa Safranin, Fuchsin, Gentiana). Man kann die Schliffe auch trocken einlegen und die Luft auspumpen. Nach vollkommener Durchtränkung wird der Schliff aus der Flüssigkeit genommen und zum Trocknen gelegt, was bei Verwendung einer rein alkoholischen Farblösung sehr schnell geht. Die Farbkrusten der Schliffflächen können abgeschabt und in Cedernöl oder Xylol auf einem Stein wegpoliert werden. Dann wird in Balsam eingelegt.

Ein drittes Verfahren zur Darstellung feiner Skelettsubstanzkanäle besteht in ihrer **Versilberung**, die man durch

einfaches Einlegen in 1 % Silbernitratlösung (ganz kurz bis 24 Stunden) und Exposition (ev. noch nach Einschluß in Balsam) im Licht, oder bei Vorhandensein von Grundsubstanz (Alkoholmaterial) durch aufeinander folgende je 24stündige Behandlung mit wässeriger ½ % Kaliummonochromat- und ¾ % Silbernitratlösung. Dann ist später in Luft trocken und unter einem umrandeten Deckglas aufzuheben.

Ein letztes sehr empfehlenswertes und oft benutztes Verfahren zur Sichtbarmachung feiner Hohlräume besteht in ihrer **Füllung mit Luft**, die z. B. sofort eintritt, wenn man die Schliffe aus Chloroform trocknen läßt. Solche Schliffe hebt man entweder in Luft unter einem am Rande durch Paraffin und einen Deckglaskitt gehaltenen Deckglas auf oder aber man legt in sehr trägflüssigen oder durch Erwärmen verflüssigten Balsam ein, der nicht in die feineren Hohlräume eindringt und bei vorheriger Erwärmung nach dem Abkühlen gleich hart wird.

An dieser Stelle mag noch einmal auf die oben (S. 101) erörterte Bedeutung des **Verhältnisses der Brechungsindices** von Objekt und Einschlußmittel hingewiesen werden. Manche Hartteile verschwinden z. B. in Kanadabalsam so stark, daß man Schwierigkeiten bei der mikrophotographischen Abbildung der Strukturen bekommt. Dann ist abgesehen von eventueller Färbung die Wahl eines weniger brechenden (Terpentin, Glycerin) oder stärker brechenden Einschlußmittels (Kolophonium mit Zusatz von benzoësaurem Benzylester oder dergl., Bromnaphtalin usw.) wenigstens für die Zeit der Beobachtung zu empfehlen.

Bei Einschluß in gewöhnlichen Balsam oder einem Einschlußmittel von ähnlicher Konsistenz sinken und **verschieben** sich die spezifisch schweren **Schliffe unter dem Deckglas** schon bei wenig geneigter Lage des Objektträgers, was z. B. beim Mikrophotographieren mit horizontalem Mikroskop dann plötzlich zu Unschärfen führen kann. Man hilft dem dadurch ab, daß man den Schnitt auf dem Objekt-

träger in einen Tropfen Balsam bringt, dann vorsichtig erhitzt, bis alles Xylol aus dem Balsam verdunstet ist, und der Balsam mehr harzige Dämpfe zu entwickeln beginnt, und endlich erkalten läßt, wobei der Balsam ganz fest und der Schliff unbeweglich wird. Dann bringt man einen kleinen Tropfen eingedickten Immersionscedernöl auf den Balsam und legt ein Deckglas auf. Stark eingedicktes Immersionsöl wird mit der Zeit fest und ist an sich dickflüssig genug um das Deckglas zu halten. Sein Brechungsindex kommt dem des Balsams so nahe, das dessen unebene Oberfläche in dem Präparat optisch nicht hervortritt.

Register.

Ohlenroth'sche Buchdruckerei Georg Richters in Erfurt.